

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/086116 A1

(51) 国際特許分類:
C07H 11/00, C12N 1/20, C12P 19/04

C12N 9/88,

Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO,Ikunoshin) [JP/JP]; 〒
611-0028 京都府 宇治市 南陵町 1-1-1 50 Kyoto
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/03853

(22) 国際出願日: 2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

(74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA,Tamotsu et al.); 〒
540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-119671 2001 年 4 月 18 日 (18.04.2001) JP
特願2001-155849 2001 年 5 月 24 日 (24.05.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 宝ホー
ルディングス株式会社 (TAKARA HOLDINGS INC.)
[JP/JP]; 〒600-8688 京都府 京都市 下京区四条通烏丸
東入長刀鉾町 2 0 番地 Kyoto (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 酒井 武
(SAKAI,Takeshi) [JP/JP]; 〒036-8183 青森県 弘前市 品
川町 1 2 0-1 ライオンズマンション品川町 2 0 3 号
Aomori (JP). 木村 ひとみ (KIMURA,Hitomi) [JP/JP];
〒036-8255 青森県 弘前市 若葉 2 丁目 9-2 9 Aomori
(JP). 猪飼 勝重 (IKAI,Katsushige) [JP/JP]; 〒520-3332
滋賀県 甲賀郡 甲南町 希望ヶ丘本町 9-4 2 1-4 5

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SULFATED FUCOGLUCURONOMANNAN

(54) 発明の名称: 硫酸化フコグルクロノマンナン

(57) Abstract: An enzyme which decomposes a sulfated fucoglucuronomannan and is useful in the field of glycotecnology; a process for producing the enzyme; a fucoidan fraction reduced in the number of the kinds of molecules and useful as a reagent in glycotecnology; a sulfated fucoglucuronomannan oligosaccharide; and processes for producing the fraction and oligosaccharide.

(57) 要約:

糖鎖工学分野において有用な硫酸化フコグルクロノマンナンを分解する酵素、
該酵素の製造方法、並びに糖鎖工学用試薬として有用な分子種の少ないフコイ
ン画分及び硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖及びそれらの製造方法。



WO 02/086116 A1

明 細 書

硫酸化フコグルクロノマンナン

5 技術分野

本発明は糖鎖工学分野において有用な硫酸化フコグルクロノマンナンを分解する酵素、該酵素の製造方法、並びに糖鎖工学用試薬として有用な分子種の少ないフコイダン画分及び硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖及びそれらの製造方法に関する。

10

背景技術

褐藻類には何種類もの硫酸化多糖が含まれている。これらの硫酸化多糖はフコイダンあるいはフコイジンと総称されることが多いが、その構造は由来となる海藻により異なる。例えば、ヒバマタ目海藻、ガゴメ、マコンブ、オキナワモズク、モズク、ワカメメカブそれぞれから抽出される硫酸化多糖は異なる構造を持つ。

また、一般に一種の海藻から硫酸化多糖画分を調製すると、数種の分子種の硫酸化多糖が混在している。

15

これまでに構造が決定された硫酸化多糖の分子種としては、硫酸化フカン、硫酸化フコグルクロノマンナン、硫酸化フコガラクトン、硫酸化グルクロノフカン等が挙げられる。硫酸化フカン画分には強い抗凝血活性、硫酸化フコグルクロノマンナン画分には癌細胞に対するアポトーシス誘導活性が報告されている等、硫酸化多糖は一般に何らかの生物活性を持つことが多い。そのため、硫酸化多糖を医薬品として開発する試みがなされている。

20

硫酸化多糖を医薬品として開発する際、その構造を決定する必要があるが、その硫酸化多糖を分解する酵素を用いれば構造を決定する際に非常に有利である。しかし褐藻類の硫酸化多糖を分解する酵素は市販されておらず、しかも褐藻類の硫酸化多糖は海藻の種によって異なるため、硫酸化多糖の構造を決めるにはその硫酸化多糖を特異的に分解する酵素が必要となる。

25

ヒバマタ目海藻由来硫酸化多糖混合物は抗凝血作用、クラミジアの子宮表皮細

胞への定着阻害作用、アレルギー反応抑制作用、移植臓器の拒絶抑制作用などを持つことが報告されている。これらの活性と構造の関係を解明するためヒバマタ目海藻由来フコイダンの構造が研究されているが、物理化学的な分析によりその平均的な構造が提唱されているに過ぎない。

- 5 また、ヒバマタ目海藻から硫酸化多糖混合物画分を調製すると、数種の分子種の硫酸化多糖が混在している。一般に、目的とする生物活性を担う分子種以外の硫酸化多糖は不必要であり、時には不必要な分子種が副作用を誘発させるだけの場合もある。

- 10 また、構造的に再現性よくヒバマタ目海藻由来硫酸化多糖のオリゴ糖を調製できれば生物活性と構造の関係を解明する際非常に有用である。例えば、国際公開第96/34004号パンフレットに記載の褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に含まれる硫酸化フコグルクロノマンナンを分解してオリゴ糖を生成させる酵素が知られている。この酵素はコンブ目褐藻類の硫酸化フコグルクロノマンナンによく作用して硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を生成させるが、ヒバマタ目
15 褐藻類の硫酸化フコグルクロノマンナンにはほとんど作用しない。

以上のことから、ヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に含まれる分子種のそれぞれを特異的に分解する酵素、より均一な分子種からなるフコイタン画分、酵素的に製造した構造が均一なオリゴ糖、及びそれらの製造方法が求められていた。

20

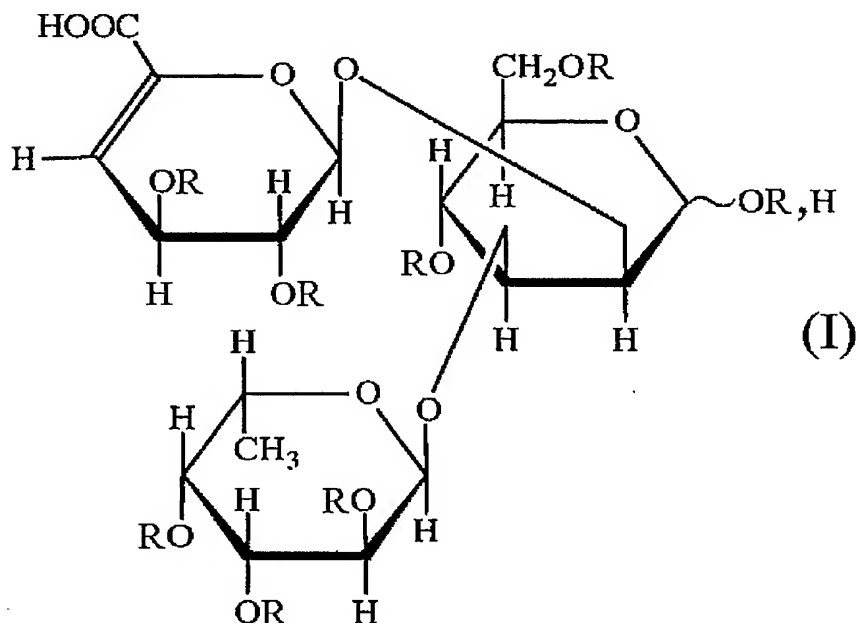
発明の目的

- 本発明の目的は、糖鎖工学的に有用なヒバマタ目海藻由来硫酸化フコグルクロノマンナンを効率よく分解する酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フコグルクロノマンナンに該酵素を作用させて得られるオリゴ糖及びその製造方法を提供することにある。また、本発明の目的は、褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分から硫酸化フコグルクロノマンナンを除去した画分及びその製造方法を提供することにある。
- 25

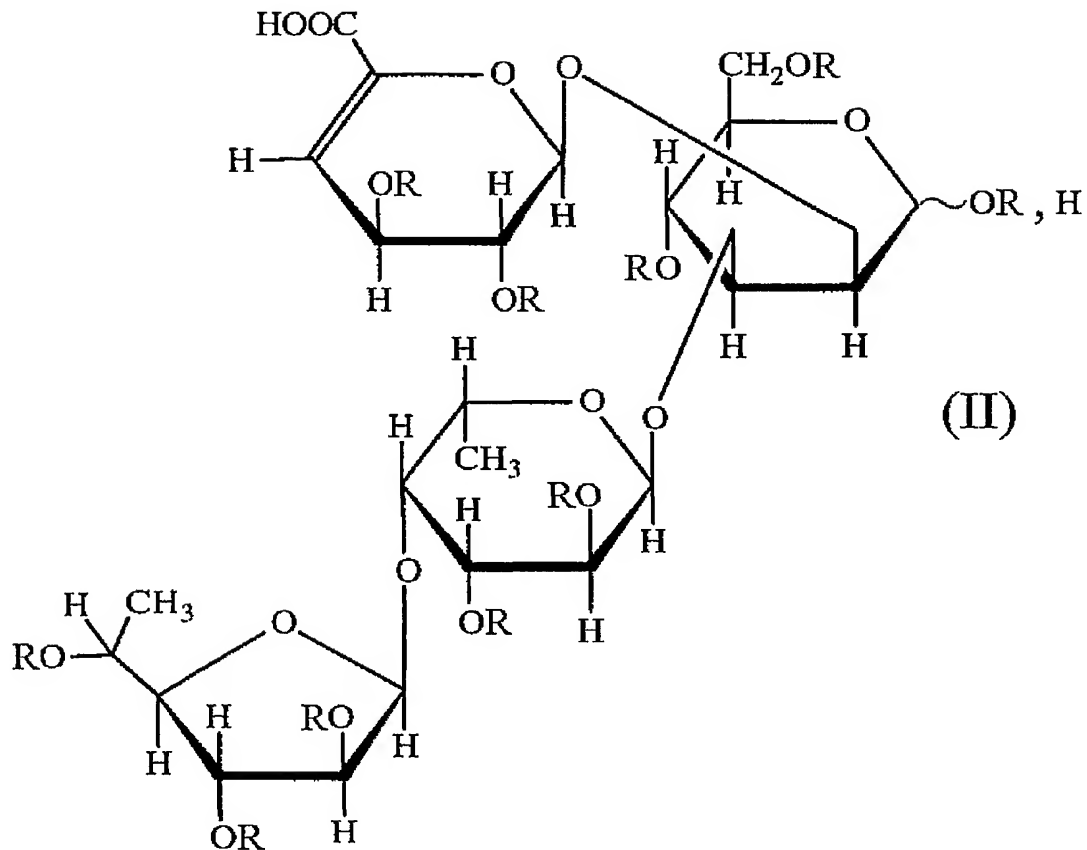
発明の概要

本発明者らは鋭意研究の結果、フコフィラス属に属する細菌の1菌株、フコフィラス フコイダノリイティカス (*Fucophilus fucoidanolyticus*) SI-1234株が、新規な硫酸化フコグルクロノマンナン分解酵素を生産することを見出し、該酵素の製造方法を見出した。また、該酵素を利用してヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分から硫酸化フコグルクロノマンナンを分解除去してフコイダン画分の純度を上げられることも見出した。また、該酵素を利用してヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分から構造の均一な新規な硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を製造できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明の第1の発明は、下記一般式 (I) 又は (II) で表される硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖又はその塩に関する。



(Rは、H又はSO₃Hである。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

本発明の第2の発明は、下記の理化学的性質を有することを特徴とする硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼに関する：

- 5 (I) 作用：ヒバマタ目海藻由来硫酸化フコグルクロノマンナンに作用してα-D-マンノシル結合を脱離的に切断し、不飽和グルクロン酸基を持つオリゴ糖を生成させる；

(I I) 至適pH：本酵素の至適pHは約6.5～8.0である；および

(I I I) 至適温度：本酵素の至適温度は約30℃～40℃である。

- 10 本発明の第2の発明の酵素は、硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ生産能を有するフコフィラス属細菌を培養する工程およびその培養物から該酵素を採取する工程を包含する方法によって得ることができる。

本発明の第1の発明の糖化合物又はその塩は、本発明の第2の発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼをヒバマタ目海藻由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分に作用させる工程を包含することを特徴とする糖化合物の製造方法によ

15

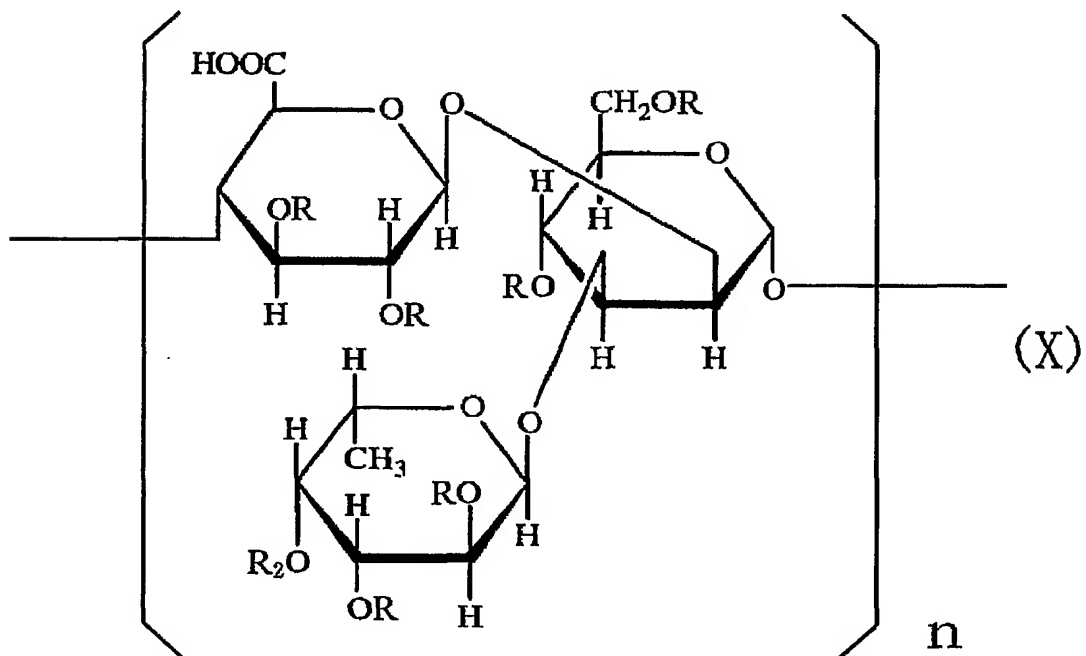
って調製することができる。

本発明の第3の発明は、褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に本発明の第2の発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させて低分子化した硫酸化フコグルクロノマンナンを除去する工程を包含する方法によって得られることを特徴とするフコイダン画分に関する。

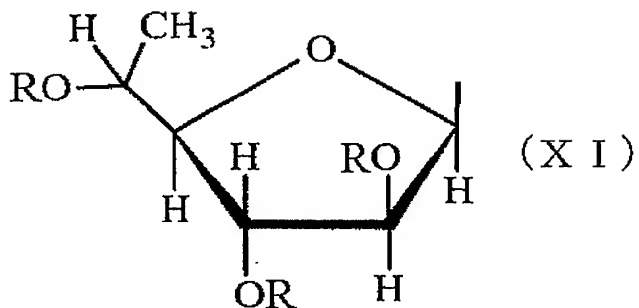
本発明の第3の発明のフコイダン画分は、褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に本発明の第2の発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させる工程およびフコイダン画分を採取する工程を包含することを特徴とするフコイダン画分の製造方法によって調製する事ができる。

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを含むことを特徴とする糖質工学用試薬に関する。

本発明の第5の発明は、下記一般式(X)で表される硫酸化フコグルクロノマンナンからなる多糖類に関する。



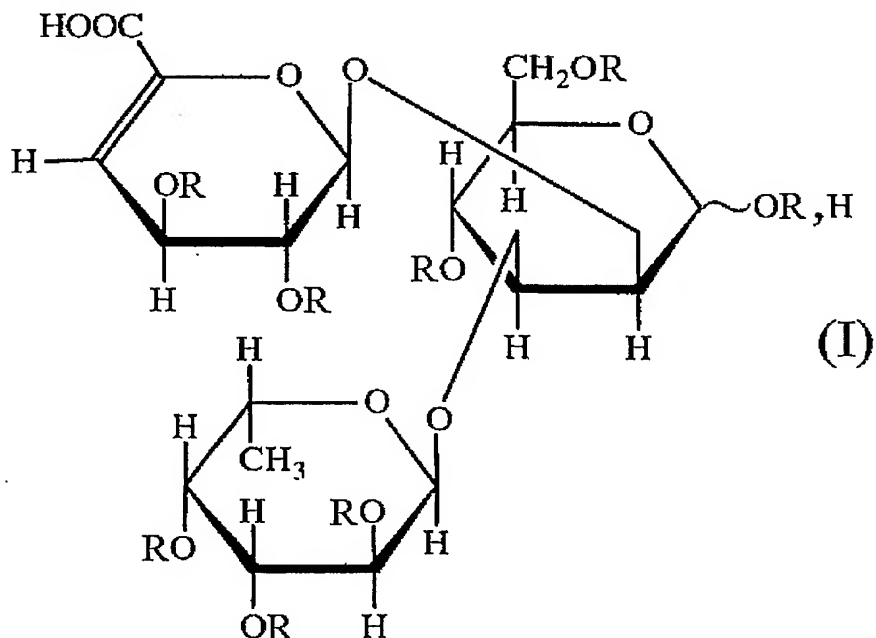
(式中、Rは、H又はSO₃Hであり、R₂は、H又はSO₃H又は下記一般式(XI)である。nは1以上の整数である。)



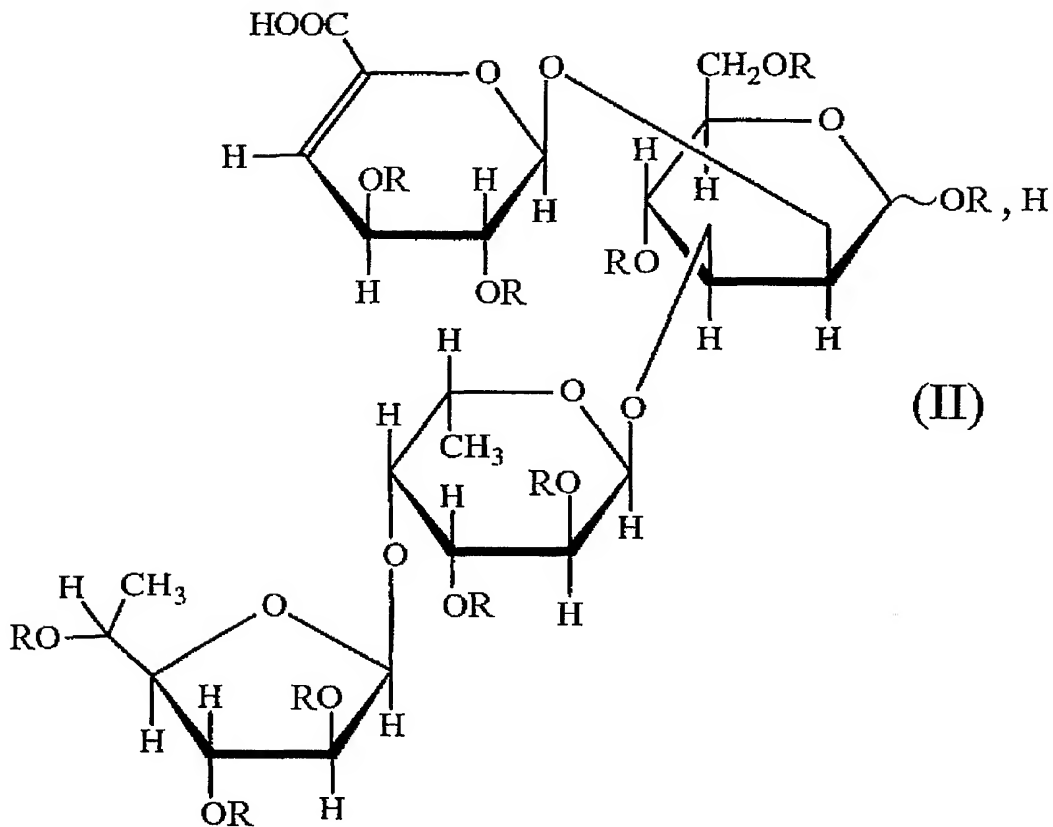
(式中、Rは、H又はSO₃Hである。)

本発明の第6の発明は、下記の理化学的性質を有することを特徴とする硫酸化フコグルクロノマンナン又はその塩に関する：

- 5 (1) 構成糖：フコース、マンノース及びグルクロン酸を含有し、
 (2) 請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼにより低分子化され、下記一般式(I)又は(I I)で表される化合物より選択される1種類以上の化合物が生成する：



(Rは、H又はSO₃Hである。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

図面の簡単な説明

- 5 図 1 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの pH と相対活性 (%) の関係を表すグラフである。
- 図 2 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの温度 (°C) と相対活性 (%) の関係を表すグラフである。
- 図 3 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 1 -
- 10 (1) の ¹H-NMR スペクトルを示す図である。
- 図 4 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 1 - (1) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。
- 図 5 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 1 -
- (2) の ¹H-NMR スペクトルを示す図である。
- 15 図 6 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 1 -

(2) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。

図 7 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (2) の ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

図 8 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (2) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。

図 9 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (3) の ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

図 10 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (3) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。

図 11 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (4) の ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

図 12 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (4) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。

図 13 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (5) の ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

図 14 : 本発明により得られる硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2 - (5) の質量分析 (マス) スペクトルを示す図である。

発明の詳細な説明

以下本発明に関して具体的に説明する。

本明細書において、硫酸化フコグルクロノマンナンとは褐藻類に含まれる硫酸化多糖で、その構成糖がフコース、マンノース及びグルクロン酸からなるものをいう。また、硫酸化フコグルクロノマンナンに本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させると、前記一般式 (I) 及び/又は (II) で表される化学構造の物質が得られる。当該硫酸化フコグルクロノマンナンの由来は特に限定されるものではないが、例えば、*Fucus vesiculosus*、*Ascophyllum nodosum*などのヒバマタ目 (Fucales) の褐藻類由来の硫酸化フコグルクロノマンナンが好適に使用できる。本明細書において硫酸化フコグルクロノマンナン画分とは硫酸化フコグルクロノマンナ

ンを含有する画分をいう。

本明細書において硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼとは、褐藻類由来硫酸化フコグルクロノマンナンに作用してマンノースとグルクロン酸の間の α -D-マンノシル結合を脱離的に切断し、不飽和グルクロン酸基を持つオリゴ糖を生成させる酵素のことをいう。

本明細書において糖化合物とは、硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖のことであり、硫酸化フコグルクロノマンナンに本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させて得られるオリゴ糖で、還元性末端糖がマンノースであるものが含まれる。

本明細書において硫酸化フコグルクロノマンナンを製造する際にはまず、褐藻類に含まれる水溶性成分を抽出する。その際硫酸化フコグルクロノマンナンの低分子化を防ぐためには、抽出の際のpHは4～9、温度は100℃以下が好ましい。また、上記抽出液中のアミノ酸や低分子性の色素等は限外ろ過で効率良く除去できる。疎水性物質の除去には活性炭処理等も有効である。

このようにして褐藻類の硫酸化多糖混合物画分が得られる。該画分を硫酸化フコグルクロノマンナン画分として例えば本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの基質として使用できる。硫酸化フコグルクロノマンナン画分を陰イオン交換カラムで分離すればより純度の高い硫酸化フコグルクロノマンナンを得られる。上記の硫酸化多糖混合物画分も陰イオン交換カラムで精製した硫酸化フコグルクロノマンナンとともに本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを精製する際の活性測定用基質、及び本発明の分子種の少ないフコイダン画分及び硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖製造時の原料として使用できる。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの製造に使用される細菌としては、硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを生産する細菌であれば特に限定はないが例えば、フコフィラス フコイダノリティカス (Fucophilus fucoidanolyticus) SI-1234株が挙げられる。

なお、上記のフコフィラス フコイダノリティカス SI-1234株はナマコの腸内より本発明者らが新たに探索して得た細菌で、その菌学的性質は次のとおりである。

a. 形態的性質

- (1) 本菌は直径 $1.2 \sim 1.6 \mu\text{m}$ の球菌である。
- (2) 胞子の有無 なし
- (3) グラム染色性 陰性

5 b. 生理的性質

- (1) 生育温度 25°C で生育する。
- (2) 酸素に対する態度 好気性
- (3) カタラーゼ 陽性
- (4) オキシダーゼ 陰性

10 (5) 塩類要求性

- 0%食塩培地での生育 陰性
- 1%食塩培地での生育 陰性
- 海水培地での生育 陽性

- (6) キノン系 メナキノン7

15 (7) 菌体内DNAのGC含量 52%

- (8) OF-テスト 酸を生成しない
- (9) 集落の色調 特徴的な集落色素を生成せず
- (10) 運動性 陰性
- (11) 滑走性 陰性
- (12) 鞭毛 なし

20

本菌株は、バーギーズ マニュアル オブ ディターミネイティブ バクテリ
オロジー (Bergey's manual of determinative bacteriology)、第9巻(1994)に記載の基本分類によれ
ばグループ4 (グラム陰性好気性桿菌及び球菌) に分類される。しかし本菌株は、
電子伝達鎖にメナキノン7を有し、GC含量が52%という点でグループ4に属
25 する菌と大いに異なる。

そこで、本菌株の16S rRNAをコードするDNA (16S rDNA) の塩基配列を決定 (配列表の配列番号1) し、既知の細菌と相同性を比較したところ16S rDNAの全域 (約1500塩基) にわたって相同性の高い既知菌

株は存在しなかった。16S rDNAの全配列の相同性が90%以下の場合、両細菌の属が同じであることはない。そこで、本発明者らは、本菌株は既知の属に属さない新属の細菌であると断定し、本菌株をフコフィラス フコイダノリィティカス SI-1234と命名した。従って、16S rDNAの塩基配列より、フコフィラス フコイダノリィティカス SI-1234と同属と判断される細菌から得られた硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼも本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼに含まれる。

なお、上記菌株は *Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234と表示され、ブタペスト条約のもと、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成11年8月18日より（移管日：平成13年3月7日）、受託番号FERM BP-7495として寄託されている。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを生産する細菌を培養するにあたり、培地に加える栄養源は使用する微生物が利用し、該酵素を生産するものであればよく、炭素源としては、例えば、硫酸化フコグルクロノマンナン、*Fucus vesiculosus*や*Ascophyllum nodosum*等の海藻、アルギン酸、ラミナラン、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫安、塩化アンモニウム、尿素、尿酸等が適当である。その他にナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛等の塩化物、リン酸塩、硫酸塩等を加えてもよい。なお、一般に海水から採取した微生物は、海水あるいは市販の人工海水中で極めて生育し易い。

また、培養条件は使用する微生物、培地組成等に応じ、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの生産量が最大になるように設定するが、一般に培養温度は15～30℃、培地のpHは5～9がよく、5～72時間の通気攪拌培養で本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの生産量は最高に達する。培養終了後、遠心分離で菌体と培養上清に分画し、それぞれから本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを得ることができる。

上記のフコフィラス フコイダノリイティカス S I - 1 2 3 4 を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常の細胞破碎手段、例えば超音波処理で菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。次いでこの抽出液から通常の精製手段により精製酵素標品を得られる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水カラムクロマト、ゲルろ過等により精製し、実質的に他の硫酸化フコース含有多糖分解酵素を含まない純化された本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを得られる。

また、上述の培養上清中にも本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼが大量に存在するので、菌体内酵素と同様の精製手段で精製できる。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フコグルクロノマンナンに作用して、 α -D-マンノシル結合を脱離的に切断し不飽和グルクロン酸基を持つオリゴ糖を生成させる。

(I I) 至適 pH：本酵素の至適 pH は約 6.5 ~ 8.0 付近にある (図 1)。

すなわち図 1 は本酵素の反応時の pH と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は pH を示す。

(I I I) 至適温度：本酵素の至適温度は約 30℃ ~ 40℃ 付近にある (図 2)。

すなわち、図 2 は本酵素の反応時の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は温度 (℃) を示す。

(I V) 分子量：本酵素の分子量は、ゲルろ過法で測定した場合、約 50 ~ 60 万である。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは、硫酸化フコグルクロノマンナン分解活性を測定して確認でき、生産菌の無細胞抽出液でも、各種カラムクロマトで精製後の酵素溶液でも確認できる。

フコフィラス フコイダノリイティカス S I - 1 2 3 4 株は硫酸化フコグルクロノマンナンを資化する微生物であり、硫酸化フコグルクロノマンナンを分解するために菌体内及び菌体外に本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを生産する。

本明細書において褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分とは、褐藻類から抽出した

フコースを含有する硫酸化多糖混合物（褐藻類由来フコイダン）を含む画分のことをいう。

本発明によれば、上記硫酸化多糖混合物画分に含まれる硫酸化フコグルクロノマンナンを酵素で分解後除去することによって分子種の少ないフコイダン画分を得ることができる。

上記分子種の少ないフコイダン画分を得るには、褐藻類から抽出した硫酸化多糖混合物画分に硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させて、低分子化した硫酸化フコグルクロノマンナンすなわち硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を例えば限外ろ過、ゲルろ過、陰イオン交換カラム処理等で除去すればよい。必要に応じて脱塩、凍結乾燥等の処理をしてもよい。

例えばヒバマタ目海藻由来硫酸化多糖混合物画分には硫酸化フカンの他に硫酸化フコグルクロノマンナン等数種の硫酸化多糖が含まれているが、硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼで硫酸化フコグルクロノマンナンを分解除去し、分子種の少ないフコイダン画分を調製できる。分子種の少ないフコイダン画分及び硫酸化フコグルクロノマンナンの分解で生成した硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は糖鎖工学用試薬として有用である。

本発明の分子種の少ないフコイダン画分を調製する際、褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分の溶解は通常の方法で行えばよく、溶解液中の当該硫酸化多糖混合物画分の濃度はその最高溶解濃度でもよいが、通常はその操作性、分解に用いる本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの量等を考慮して選定すればよい。該硫酸化多糖混合物画分の溶解液は、水、緩衝液等より目的に応じて選択すればよい。溶解液のpHは通常中性付近で、酵素反応は通常30℃付近で行う。分子種の少ないフコイダン画分は、必要に応じて更にイオン交換樹脂処理、限外ろ過等で精製してもよく、必要に応じて脱塩処理、無菌処理、凍結乾燥処理もできる。

本発明の分子種の少ないフコイダン画分に含まれる物質は、硫酸基及び／又はカルボキシル基を分子中に有しており、該基は種々の塩基と反応し、塩を形成する。本発明の分子種の少ないフコイダン画分に含まれる物質は、塩になった状態が安定であり、通常ナトリウム、カリウム及び／又はカルシウム等の塩の形態で提供される。これらの物質の塩はダウエックス50W等の陽イオン交換樹脂を利

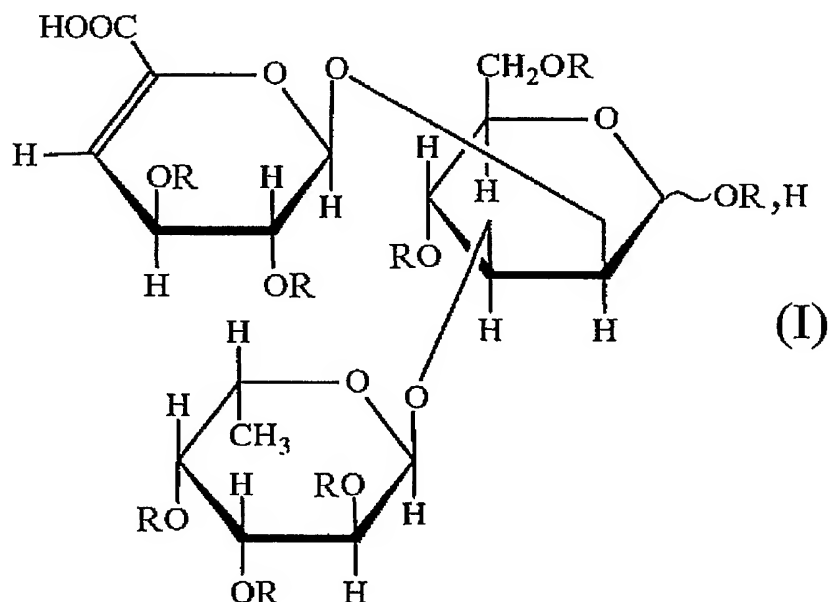
用して遊離の本発明の分子種の少ないフコイダン画分に含まれる物質に導ける。また、これらは、必要に応じ公知慣用の塩交換を行い所望の種々の塩に交換できる。

本発明の分子種の少ないフコイダン画分に含まれる物質は、薬学的に許容される塩、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アンモニウム、亜鉛等の塩とすることができる。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを硫酸化フコグルクロノマンナン、若しくは硫酸化フコグルクロノマンナン含有物に作用させて調製できる。硫酸化フコグルクロノマンナン含有物としては、例えば硫酸化フコグルクロノマンナンの部分精製品、褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分、褐藻類の水溶性抽出物、若しくは褐藻類藻体が好適に使用できる。

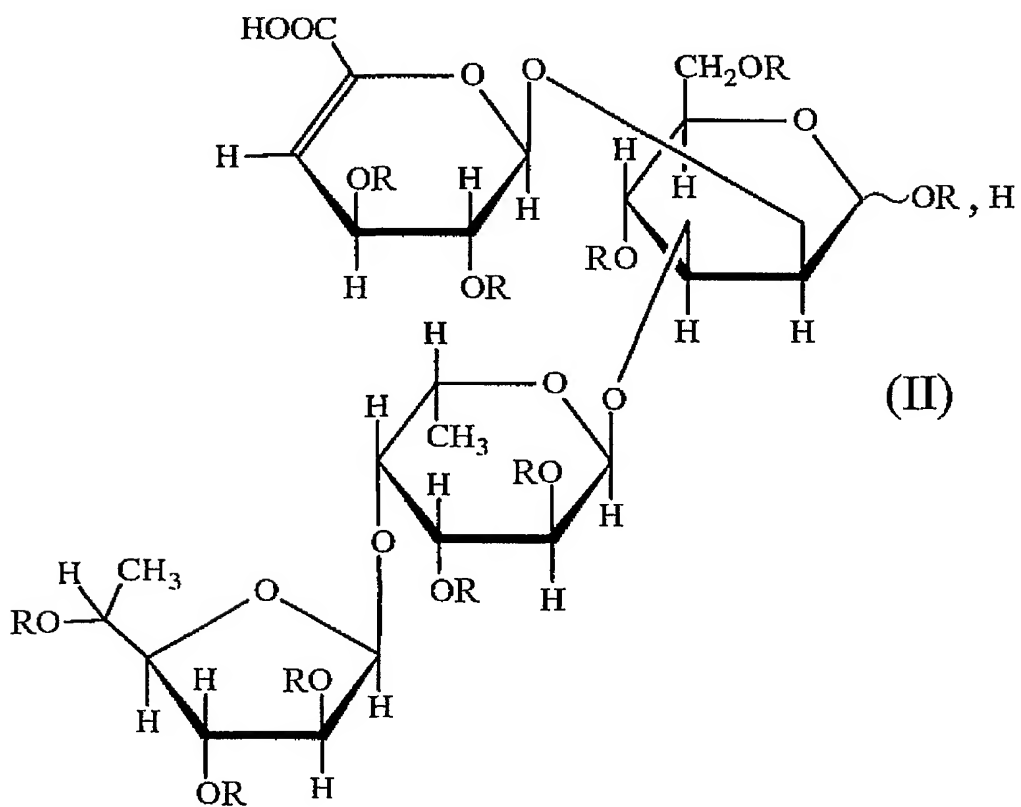
本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を調製する際、硫酸化フコグルクロノマンナン、若しくは硫酸化フコグルクロノマンナン含有物の溶解は常法で行えばよく、溶解液中の硫酸化フコグルクロノマンナン、若しくは硫酸化フコグルクロノマンナン含有物の濃度はその最高溶解濃度でもよいが、通常はその操作性、反応に使用する本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの量等を考慮して選定すればよい。硫酸化フコグルクロノマンナンの溶解液としては、水、緩衝液等より目的に応じて選択すればよい。溶解液のpHは通常中性付近で、酵素反応は通常30℃付近で行う。反応に使用する本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの使用量、反応液の組成、反応時間等の調整により、硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖の分子量を調整できる。この様にして得られた本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を分子量分画あるいは陰イオン交換カラムで分画して、更に均一な分子量の本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を調製できる。分子量分画は定法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法を使用すればよい。低分子化物は、必要に応じて更にイオン交換樹脂処理、活性炭処理等の精製操作を行ってもよく、必要に応じて脱塩処理、無菌処理、凍結乾燥処理もできる。これらの方法で、後述のごとく、NMR分析で構造決定可能な均一な構造の本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を得られる。例えば

この硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は以下の式 (I) 又は (I I) で表される化合物が挙げられる。本発明を特に限定するものではないが、好適には、下記式 (I)、(I I) において R は少なくとも 1 つの SO_3H である。



5

(R は、H 又は SO_3H である。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は、硫酸基及びカルボキシル基を分子中に有しており、該基は種々の塩基と反応し、塩を形成する。本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は、塩になった状態が安定であり、通常ナトリウム、カリウム及び／又はカルシウム等の塩の形態で提供される。これらの物質の塩はダウエックス50W等の陽イオン交換樹脂を利用して遊離の本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖に導ける。また、これらは、必要に応じ公知慣用の塩交換を行い所望の種々の塩に交換できる。

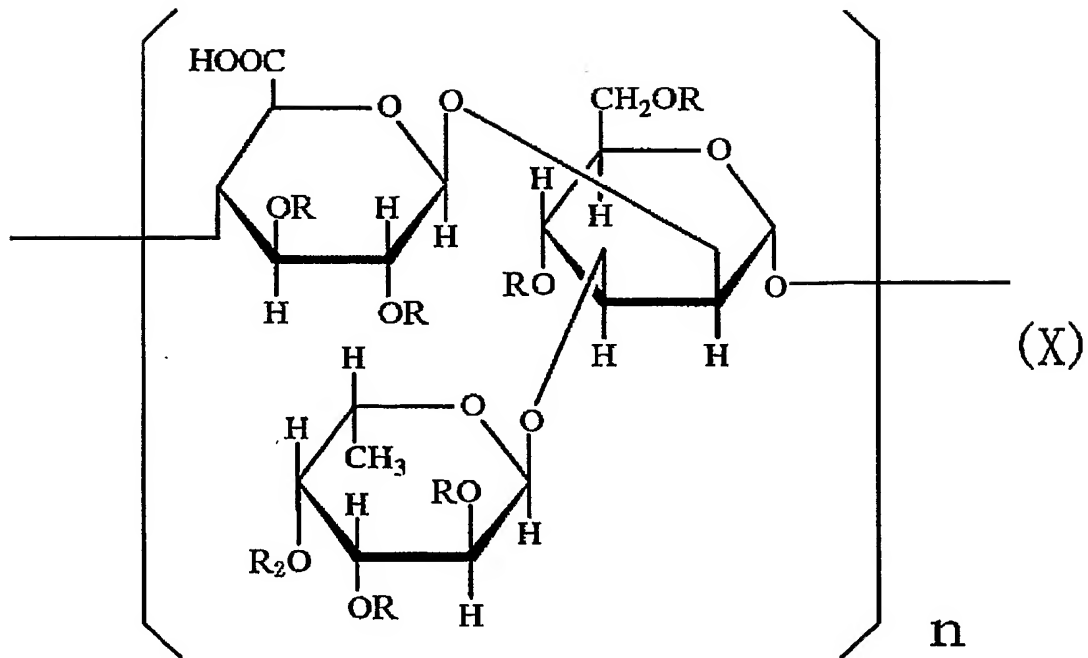
本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は、薬学的に許容される塩、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アンモニウム、亜鉛等の塩とすることができる。

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは硫酸化フコグルクロノマンナンを低分子化するため硫酸化フコグルクロノマンナンの構造解析に使用できる。また、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖は糖鎖工学用試薬として使用できる。例えば、特公平5-65108号公報記載の方法により2-アミノピリジル化(PA化)を行い、後述のごとく該オリゴ糖のPA化物を調製すれば、フコフラノシダーゼや5-硫酸化フコフラノシダーゼの基質として使用できるなど糖鎖工学用試薬として極めて有用な物質を提供することができる。

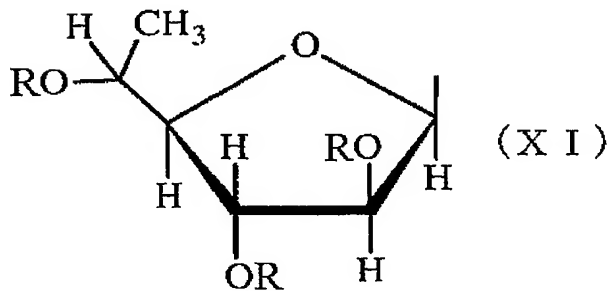
本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンは、グルクロン酸とマンノースが交互に結合した糖鎖のマンノースからフコースの側鎖が伸びている構造を持つ多糖である。この多糖は、2価の陽イオンによる架橋などにより重合している事も多いが、それらを切断した場合の分子量は、特に限定はされないが、5000～200万の範囲、さらに好ましくは、1万～100万の範囲である。特に限定はされないが例えば、下記一般式(X)で表されるものが例示される。下記一般式

(X)において、nは、1以上の整数であり、好ましくは、5～2000の範囲、さらに好ましくは10～1000の範囲である。

17



(式中、Rは、H又は SO_3H であり、 R_2 は、H又は SO_3H 又は下記一般式(X I)である。nは1以上の整数である。)



5

(式中、Rは、H又は SO_3H である。)

実施例

以下に本発明を実施例をもって具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

10

参考例1 *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖混合物画分の調製

乾燥した*Fucus vesiculosus* 藻体を粉碎し、その1kgを10リットルの80%エタノールに懸濁し、25℃で3時間攪拌後ろ過、洗浄し残

渣を得た。その残渣を30リットルの100mM塩化ナトリウムを含む30mMリン酸緩衝液（pH6.5）中に懸濁し、95℃で2時間処理後、30℃に冷却し、100gの活性炭、3000Uのアルギン酸リアーゼ（ナガセ生化学工業製）、及び3.75リットルのエタノールを添加し24時間攪拌後、遠心分離して上清を得た。その上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機で4リットルに濃縮後、100mM塩化ナトリウムで溶媒を置換した。この溶液を5℃まで冷却し、0.5N塩酸でpHを2.0とし、生じた沈殿を遠心分離で除去し、上清を得た。その上清のpHを1N水酸化ナトリウムで8.0とし、上記の限外ろ過機で2リットルに濃縮後、20mM塩化ナトリウムで溶媒を置換し、遠心分離で不溶物を除去後、凍結乾燥して80gの*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖混合物画分を得た。

参考例2 *Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖混合物画分の調製

市販の*Ascophyllum nodosum*粉末1kgから、参考例1と同様の方法で100gの*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖混合物画分を得た。

参考例3 ガゴメコンブ由来硫酸化多糖混合物画分の調製

市販の乾燥ガゴメコンブをカッターミル（増幸産業製）で破碎してチップとし、1kgのチップから、参考例1と同様の方法で38gのガゴメコンブ由来硫酸化多糖混合物画分を得た。

参考例4 *Fucus vesiculosus*由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分の調製

7gの参考例1記載の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖混合物画分を700mlの100mM塩化ナトリウムを含む20mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH6.0）に溶解し、同緩衝液で平衡化させた5リットルのDEAEセルロファイブA-800にかけた。試料を流した後、10リットルの同緩衝液で洗浄し、100～1600mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、分取（500ml）した。各画分に含まれる総糖量をフェノール硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾール硫酸法で測定した。溶出塩化ナトリウム濃度200～7

00 mMの画分を、限外ろ過（排除分子量10万）で濃縮、脱塩後凍結乾燥し、1.3 gの*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分を得た。

参考例5 *Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分の調製

7 gの参考例2記載の*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖混合物画分から、参考例4と同様の方法で1.1 gの*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分を得た。

参考例6 ガゴメコンブ由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分の調製

7 gの参考例3記載のガゴメコンブ由来硫酸化多糖混合物画分を700 mlの150 mM塩化ナトリウムを含む20 mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、同緩衝液で平衡化させた5リットルのDEAEーセルロファインA-800にかけた。試料を流した後、10リットルの同緩衝液で洗浄し、150～1950 mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、分取（500 ml）した。溶出画分に含まれる総糖量をフェノール硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾール硫酸法で測定した。溶出塩化ナトリウム濃度350～490 mMの画分を限外ろ過（排除分子量10万）で濃縮、脱塩後凍結乾燥し、1.32 gのガゴメコンブ由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分を得た。

参考例7 硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ活性測定方法

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは硫酸化フコグルクロノマンナンに作用すると、不飽和グルクロン酸基を持つオリゴ糖を生成させるため、232 nmの吸光度が増加する。これを利用して下記の方法で硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの活性を測定した。また、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは*Fucus vesiculosus*及び*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フコグルクロノマンナンに作用するが、ガゴメコンブ由来硫酸化フコグルクロノマンナンにも作用するので活性の測定には調製がより容易なガゴメコンブ由来硫酸化フコグルクロノマンナンを基質に用いた。

すなわち、50 μ lの2.5%の参考例6記載のガゴメコンブ由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分溶液と、50 μ lの100 mMリン酸緩衝液（pH 7.

5) と、 $10\mu\text{l}$ の 4M 塩化ナトリウムと $10\mu\text{l}$ の本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼとを混合し、 37°C で 3 時間反応させた後、反応液 $105\mu\text{l}$ を 2ml の冷水で希釈しその 232nm の吸光度を測定した。対照として、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの代わりに、その酵素溶液の溶媒を用いて反応させたもの及び硫酸化フコグルクロノマンナン画分の代わりに水を用いて反応させたものを同様に分析した。

1 単位の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ活性は上記反応系において 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の不飽和グルクロン酸基を生成する酵素量とした。該酵素の活性は下記式により求めた。

$$\Delta_{232} \times 2.105 / 5.5 / 180 / 0.01 = \text{U} / \text{ml}$$

Δ_{232} : 232nm における吸光度の増加量

2.105 : 吸光度を測定した試料の液量 (ml)

5.5 : 不飽和グルクロン酸基の mM 分子吸光係数

180 : 反応時間 (分)

0.01 : 酵素液量 (ml)

また、タンパク質の定量は、酵素液の 280nm の吸光度を測定することにより行ない、その際 $1\text{mg} / \text{ml}$ の蛋白質溶液の吸光度を 1.0 として計算した。

実施例 1 硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの調製

フコフィラス フコイダノリイティカス SI-1234 を参考例 1 に記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖混合物画分 0.2% とペプトン 1% を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー製) ($\text{pH} 8.0$) からなる培地 600ml を 120°C 、20 分間オートクレーブ処理した培地に接種し、 24°C で 72 時間培養して種培養液とした。参考例 1 に記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖混合物画分 0.2%、ペプトン 1%、及び消泡剤 (KM70、信越化学工業製) を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー製) $\text{pH} 8.0$ からなる培地 20リットル を 30リットル のジャーファーメンターに入れ、 120°C 、20 分間処理した培地に、上記の種培養液を接種し、毎分 125 回転の回転速度で、 24°C で 48 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。

この菌体を600mlの400mM塩化ナトリウムと10mM塩化カルシウムを含む20mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清を同じ緩衝液で充分透析し、遠心分離して上清、すなわち、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ粗酵素溶液を得た。

なお、上記の培養上清と粗酵素溶液に含まれる、硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ活性を測定した結果、培養液上清には培地1mlあたり1mU、菌体抽出液には培地1mlあたり2mUの活性が検出された。

実施例2 硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ粗酵素溶液を用いた硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖の調製、精製、及び構造解析(1)

(1) 調製

参考例1記載の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖混合物画分に実施例1記載の粗酵素溶液を作用させ本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を調製した。すなわち、5gの*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖画分を500mlの300mM塩化ナトリウム及び50mM塩化カルシウムを含む25mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.0)に溶解後、50mlの実施例1記載の粗酵素溶液を加え、25℃で4日間反応させた。反応液を遠心分離し、得られた上清を排除分子量1万のホロファイバーを装着させた限外ろ過装置にかけ、分子量1万以下のオリゴ糖画分を回収し、硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画分1とした。

(2) 精製

実施例2-(1)で得られた硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画分1を脱塩装置(マイクロアシライザーG3、旭化成工業製)で脱塩し、10mMとなるようにイミダゾールを、10mMとなるように塩化ナトリウムを添加し、10mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した1リットルのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、2リットルの同じ緩衝液で洗浄後、10~1200mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、分取した。各フラクションの232nmの吸光度を測定し、総糖量をフェノール-硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾール-硫酸法で測定した。

その結果、洗浄の後半及び360mM塩化ナトリウムで溶出する部分に、232nmの吸光度と総糖量と総ウロン酸量が比例するピークが存在していたのでそれぞれのピーク部分を集めオリゴ糖1-(1)及び1-(2)画分とした。

オリゴ糖1-(1)画分に水を加えて、導電率を5mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)と同じにし、5mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した30mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、60mlの同じ緩衝液で洗浄した。素通り画分を集め、エバポレーターで2.8mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(2×32cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩後、乾固した。こうして1.6mgの本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(1)を得た。

オリゴ糖1-(2)画分に水を加えて、導電率を200mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)と同じにし、200mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した20mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、40mlの同じ緩衝液で洗浄した。次に、200-500mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、240-320mM塩化ナトリウム溶出画分を集め、エバポレーターで1.0mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(2×32cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩後乾固した。こうして6.4mgの本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(2)を得た。

(3) 構造解析

実施例2-(2)で得られた本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(1)及び1-(2)を2-アミノピリジンで蛍光標識し、還元末端糖及び糖組成の分析を行ったところ、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(1)及び1-(2)の還元性末端糖はともにマンノースであった。また、中性糖組成は、ともにフコースとマンノースからなるものであった。次に、硫酸含量(塩化バリウムを用いた比濁法による)、ウロン酸含量(カルバゾール-硫酸法による)を測定し、質量分析装置(API-III、パーキンエルマー・サ

イエクス社製)で質量を分析した。また、JNM- α 500型核磁気共鳴装置
(日本電子社製)でNMR分析を行った。分析試料は定法により重水で置換後、
構造解析を行った。構成糖の結合様式は、 ^1H -検出異種核検出法であるHMB
C法を用いて行った。 ^1H -NMRの帰属にはDQF-COSY法及びHOHA
5 HA法を用いた。

以下に本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(1)及び1-(
(2)の物性を示す。

(a) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(1)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトル
10 を図3に、マスペクトルを図4にそれぞれ示した。図3において縦軸はシグナ
ルの強度を、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。また、図4において、縦軸
は相対強度(%)を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量; 484

MS m/z 483.3 $[\text{M}-\text{H}^+]^-$

15 ^1H -NMRによる分析結果を表1に示す。

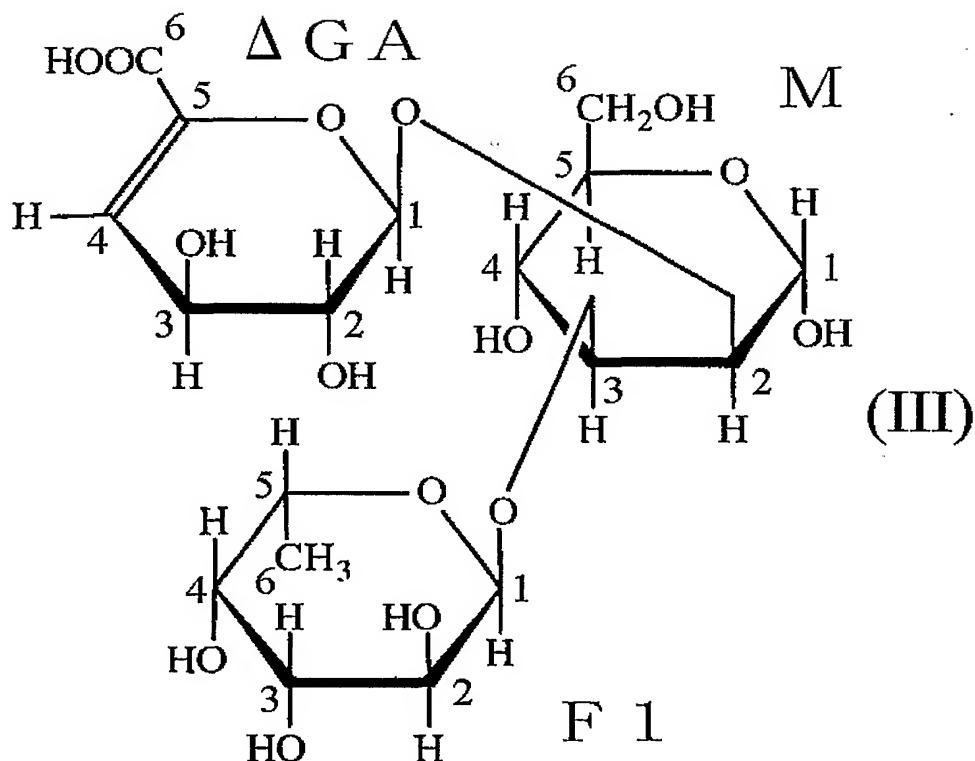
表 1

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
F 1-1	5.08, d, 4.0
F 1-2	3.78, m
F 1-3	3.86, dd, 3.5, 10.0
F 1-4	3.73, m
F 1-5	4.18, m
F 1-6	1.12, d, 7.0
M-1	5.29, d, 1.5
M-2	4.24, dd, 1.5, 3.0
M-3	3.90, dd, 3.0, 9.0
M-4	3.78, m
M-5	3.78, m
M-6	3.78, m
ΔGA-1	5.02, d, 7.0
ΔGA-2	3.65, t, 7.0
ΔGA-3	4.18, m
ΔGA-4	5.68, d, 3.5
ΔGA-5	—
ΔGA-6	—

糖組成 L-フコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 1 : 1 : 1

硫酸基 なし

- 5 なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (I I I) の通りである。



(b) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖1-(2)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図5に、マスペクトルを図6にそれぞれ示した。図5において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図6において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量 ; 724

MS m/z 723.1 $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ 、766.7 $[\text{M}+2\text{Na}^+-3\text{H}^+]^-$ 、790.5 $[\text{M}+3\text{Na}^+-4\text{H}^+]^-$ 、360.9 $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2-}$ 、372.0 $[\text{M}+\text{Na}^+-3\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMRによる分析結果を表2に示す。

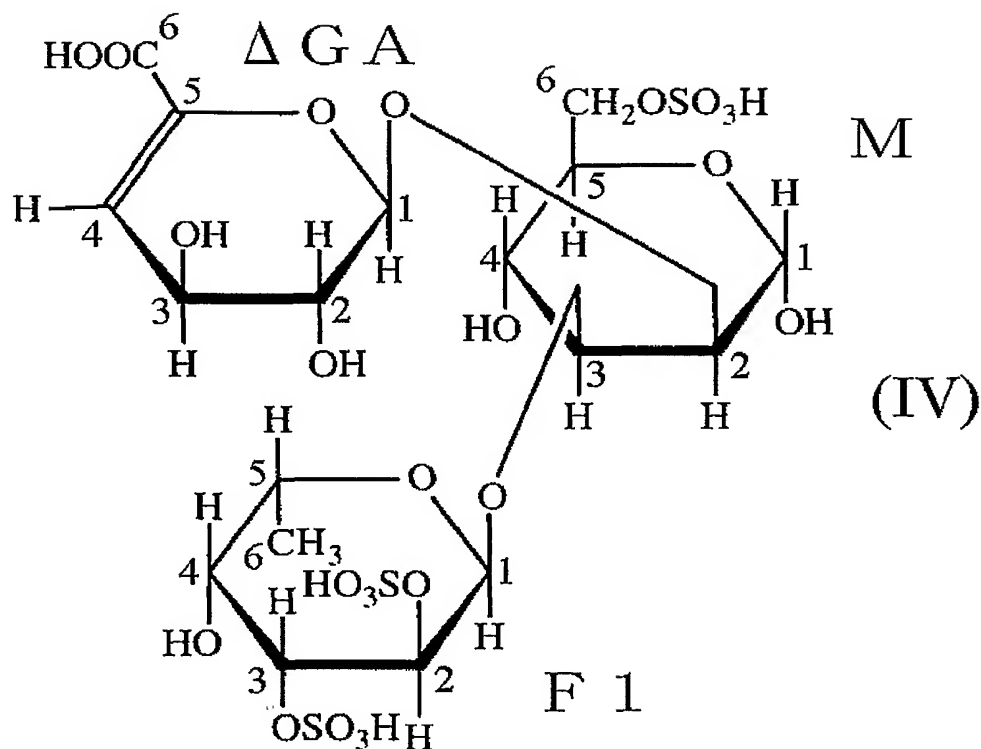
表 2

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
F 1-1	5.30, d, 4.0
F 1-2	4.42, dd, 4.0, 10.0
F 1-3	4.52, dd, 3.0, 10.0
F 1-4	4.06, d, 3.0
F 1-5	4.13, m
F 1-6	1.09, d, 6.5
M-1	5.31, d, 2.5
M-2	4.25, m
M-3	3.91, m
M-4	3.85, t, 9.0
M-5	3.93, m
M-6	4.10, dd, 6.0, 11.0 4.22, m
ΔGA-1	5.18, d, 7.0
ΔGA-2	3.60, t, 7.0
ΔGA-3	4.20, dd, 3.0, 7.0
ΔGA-4	5.59, d, 3.0
ΔGA-5	—
ΔGA-6	—

糖組成 L-ブコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 1 : 1 : 1

硫酸基 3分子

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (I V) の通りである。



実施例 3 硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ粗酵素溶液を用いた硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖の調製、精製、及び構造解析 (2)

(1) 調製

5 参考例 4 記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分に実施例 1 記載の粗酵素溶液を作用させ本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を調製した。すなわち、0.61g の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分を 60ml の 400mM 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解後、300mM 塩化ナトリウムと 5mM EDTA と 5mM アジ化ナトリウムを含む 20mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.0) に透析した実施例 1 記載の粗酵素溶液を 6ml 加え、25℃ で 7 日間反応させた。反応液を遠心分離し、得られた上清を限外ろ過 (排除分子量 1 万) し、分子量 1 万以下のオリゴ糖画分を回収し、硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画分 2 とした。

15 (2) 精製

実施例 3 - (1) で得られた硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画分 2 を 40ml に濃縮し、10% エタノールで平衡化させたセルロファイン GCL-

1000 (4×87 cm) にかき、溶出液を10 ml ずつ分画した。第70ー100画分を集め、脱塩装置（マイクロアシライザーG3、旭化成工業製）で脱塩後、10 mMとなるようにイミダゾールを添加し、10 mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した80 ml のDEAEーセルロファインAー800のカラムにかき、160 ml の同じ緩衝液で洗浄後、0ー800 mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、分取した。各フラクションの232 nmの吸光度を測定し、総糖量をフェノールー硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾールー硫酸法で測定した。その結果、232 nmの吸光度と総糖量と総ウロン酸量が比例する明瞭なピークが5個検出されたのでそれぞれのピーク部分を集め、溶出塩濃度の低い順にオリゴ糖2ー（1）～（5）画分とした。

オリゴ糖2ー（1）～（5）画分をそれぞれエバポレーターで4 ml に濃縮後、10 %エタノールで平衡化させたセルロファインGCLー25のカラム（2×32 cm）にかき、10 %エタノールで溶出して脱塩後、乾固した。こうして3.5 mg、3.9 mg、1.9 mg、1.7 mg、0.9 mg の本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖2ー（1）～（5）を得た。

（3）構造解析

実施例3ー（2）で得られた本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖2ー（1）～（5）を、2ーアミノピリジンで蛍光標識し、還元末端糖及び糖組成の分析を行ったところ、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖2ー（1）～（5）の還元性末端糖は総てマンノースであった。また、中性糖組成は、総てフコースとマンノースからなるものであった。次に、硫酸含量（塩化バリウムを用いた比濁法による）、ウロン酸含量（カルバゾールー硫酸法による）を測定し、質量分析装置（APIーIII、パーキンエルマー・サイエクス社製）で質量を分析した。また、JNMーα500型核磁気共鳴装置（日本電子社製）でNMR分析を行った。分析試料は定法により重水で置換後、構造解析を行った。構成糖の結合様式は、¹Hー検出異種核検出法であるHMB C法を用いて行った。¹HーNMRの帰属にはDQFーCOSY法及びHOHAHA法を用いた。

以下に本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖2ー（1）～（5）の物性を示す。

(a) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2- (1) の物性

上記分析の結果、本物質は本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 1- (1) と同じ物質であることが判明した。

(b) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2- (2) の物性

5 質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図7に、マスペクトルを図8にそれぞれ示した。図7において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図8において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量 ; 564

10 MS m/z 563.0 $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ 、585.0 $[\text{M}+\text{Na}^+-2\text{H}^+]^-$
281.0 $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMRによる分析結果を表3に示す。

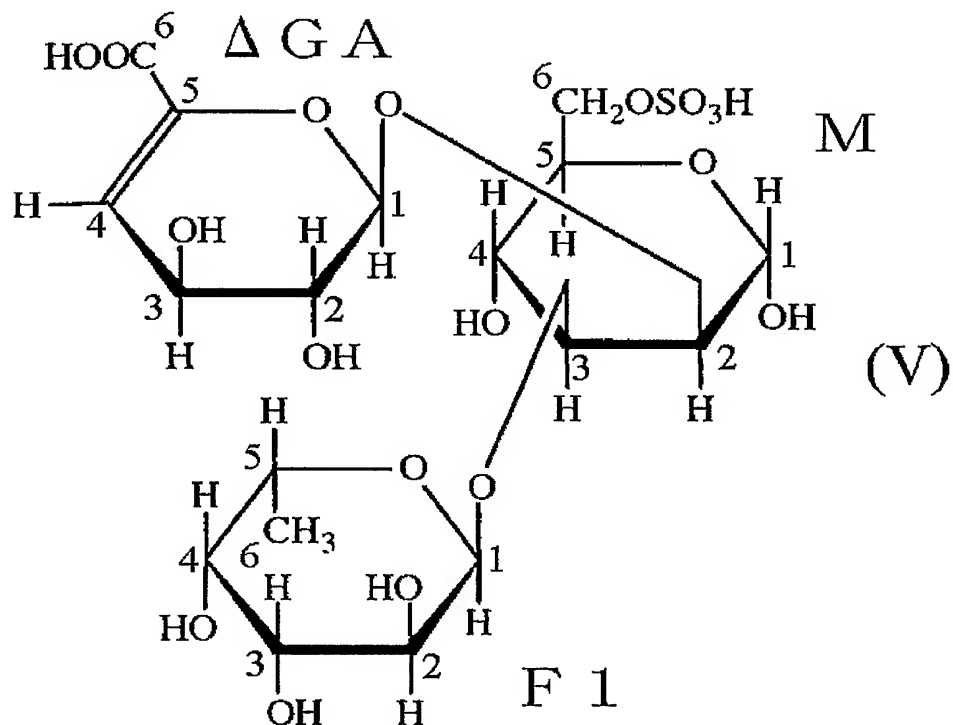
表 3

	化学シフト値 (ppm)
	^1H -NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
F1-1	5.05, d, 4.0
F1-2	3.75, m
F1-3	3.82, dd, 3.0, 11.0
F1-4	3.71, m
F1-5	4.15, m
F1-6	1.10, d, 6.0
M-1	5.27, s
M-2	4.22, m
M-3	3.88, dd, 2.5, 10.0
M-4	3.78, t, 10.0
M-5	3.95, m
M-6	4.15, m 4.22, m
$\Delta\text{GA}-1$	4.99, d, 6.5
$\Delta\text{GA}-2$	3.63, t, 6.5
$\Delta\text{GA}-3$	4.15, m
$\Delta\text{GA}-4$	5.66, d, 3.5
$\Delta\text{GA}-5$	—
$\Delta\text{GA}-6$	—

糖組成 L-フコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 1 : 1 : 1

硫酸基 1分子

なお、 ^1H -NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (V) の通りである。



5 (c) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2- (3) の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図9に、マスペクトルを図10にそれぞれ示した。図9において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図10において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

10 分子量 ; 644

MS m/z 321.3 $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMRによる分析結果を表4に示す。

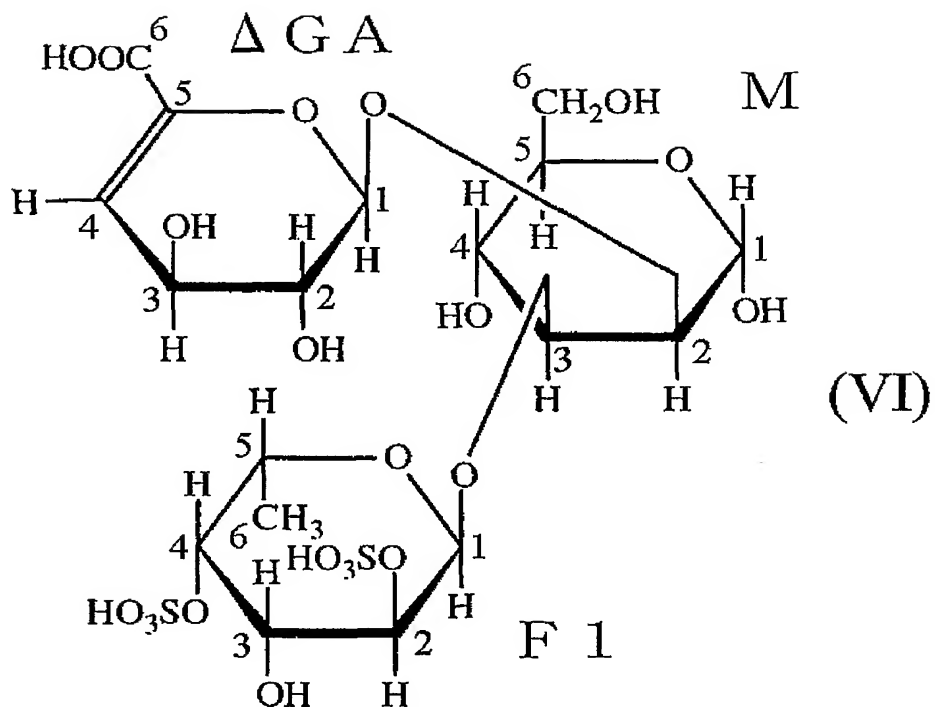
表 4

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
F 1-1	5.25, d, 3.5
F 1-2	4.32, dd, 3.5, 10.5
F 1-3	4.02, dd, 3.5, 10.5
F 1-4	4.55, d, 3.5
F 1-5	4.39, q, 6.5
F 1-6	1.16, d, 6.5
M-1	5.29, d, 2.0
M-2	4.20, dd, 2.0, 2.5
M-3	3.86, dd, 2.5, 7.0
M-4	3.75, m
M-5	3.75, m
M-6	3.75, m
ΔGA-1	5.45, d, 7.0
ΔGA-2	3.57, t, 7.0
ΔGA-3	4.27, dd, 3.5, 7.0
ΔGA-4	5.62, d, 3.5
ΔGA-5	—
ΔGA-6	—

糖組成 L-フコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 1 : 1 : 1

硫酸基 2分子

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (V I) の通りである。



(d) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2- (4) の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図 1 1 に、マススペクトルを図 1 2 にそれぞれ示した。図 1 1 において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図 1 2 において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量 ; 870

MS m/z 456.1 $[\text{M} + 2\text{Na} - 4\text{H}^+]^{2-}$ 、445.0 $[\text{M} + \text{Na} + -3\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMRによる分析結果を表 5 ~ 6 に示す。

表 5

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR
	化学シフト値、多重度、結合定数
F 1-1	5. 2 9, d, 4. 0
F 1-2	4. 4 5, d d, 4. 0, 1 0. 5
F 1-3	4. 5 9, d d, 3. 0, 1 0. 5
F 1-4	4. 1 5, d, 3. 0
F 1-5	4. 2 6, q, 6. 0
F 1-6	1. 1 0, d, 6. 0
F 2-1	5. 1 9, s
F 2-2	4. 1 2, m
F 2-3	3. 7 5, m
F 2-4	3. 7 5, m
F 2-5	3. 7 5, m
F 2-6	1. 1 0, d, 6. 0

表 6

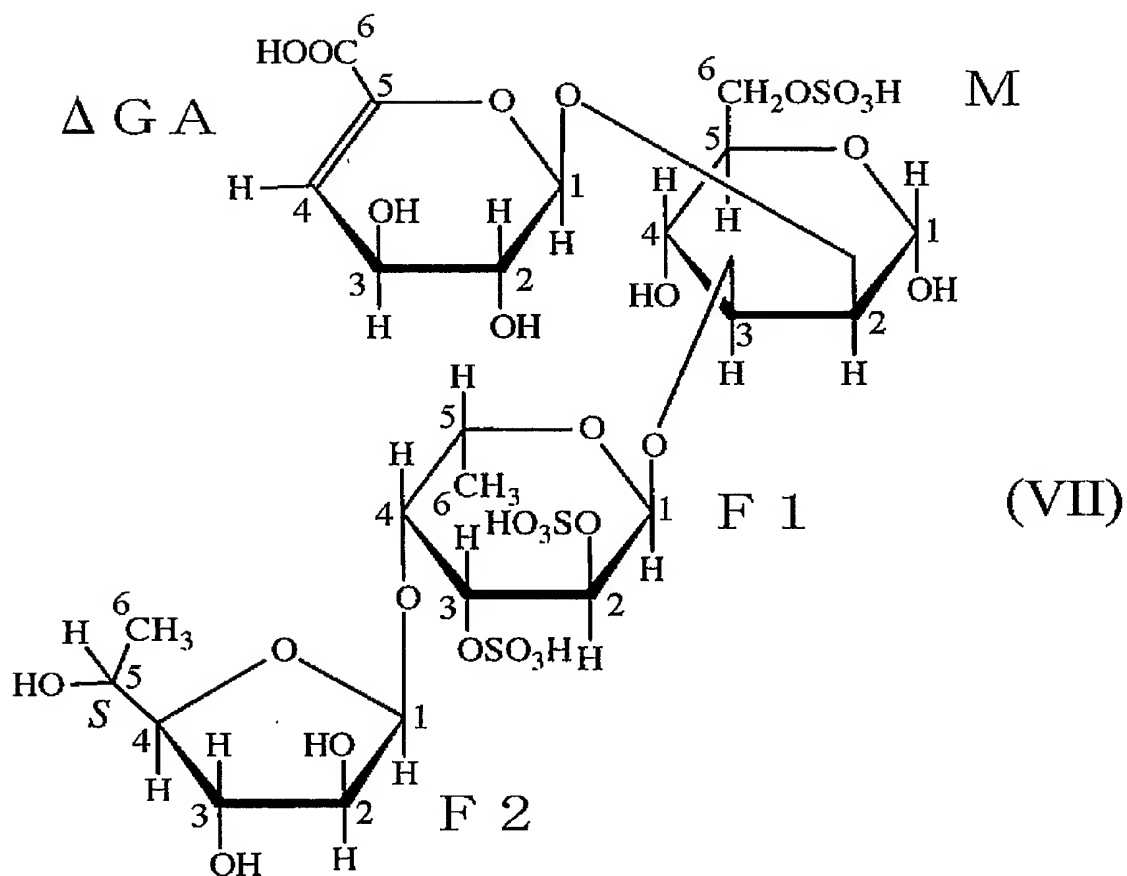
	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR
	化学シフト値、多重度、結合定数
M-1	5. 3 0, d, 2. 0
M-2	4. 2 4, m
M-3	3. 9 1, m
M-4	3. 8 3, t, 9. 5
M-5	3. 9 1, m
M-6	4. 0 9, d d, 6. 0, 1 1. 0 4. 1 8, m
Δ G A-1	5. 1 7, d, 7. 0
Δ G A-2	3. 6 0, t, 7. 0
Δ G A-3	4. 1 9, d d, 3. 0, 7. 0
Δ G A-4	5. 5 8, d, 3. 0
Δ G A-5	—
Δ G A-6	—

糖組成 L-フコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 2 : 1 : 1

5 硫酸基 3分子

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (V I I) の通りである。

34



(e) 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2- (5) の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトル
 を図 1 3 に、マスペクトルを図 1 4 にそれぞれ示した。図 1 3 において縦軸は
 シグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図 1 4 におい
 て、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量 ; 950

MS m/z 1037.0 $[\text{M} + 4\text{Na} - 5\text{H}^+]^-$ 、506.9 $[\text{M} + 3\text{Na} - 5\text{H}^+]^{2-}$ 、495.8 $[\text{M} + 2\text{Na}^+ - 4\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMRによる分析結果を表 7 ~ 8 に示す。

表 7

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
F 1-1	5.30, d, 4.0
F 1-2	4.47, dd, 4.0, 11.0
F 1-3	4.61, m
F 1-4	4.15, d, 2.5
F 1-5	4.28, m
F 1-6	1.11, d, 6.0
F 2-1	5.18, s
F 2-2	4.12, m
F 2-3	3.93, m
F 2-4	3.93, m
F 2-5	4.52, dq, 1.5, 6.5
F 2-6	1.30, d, 6.5

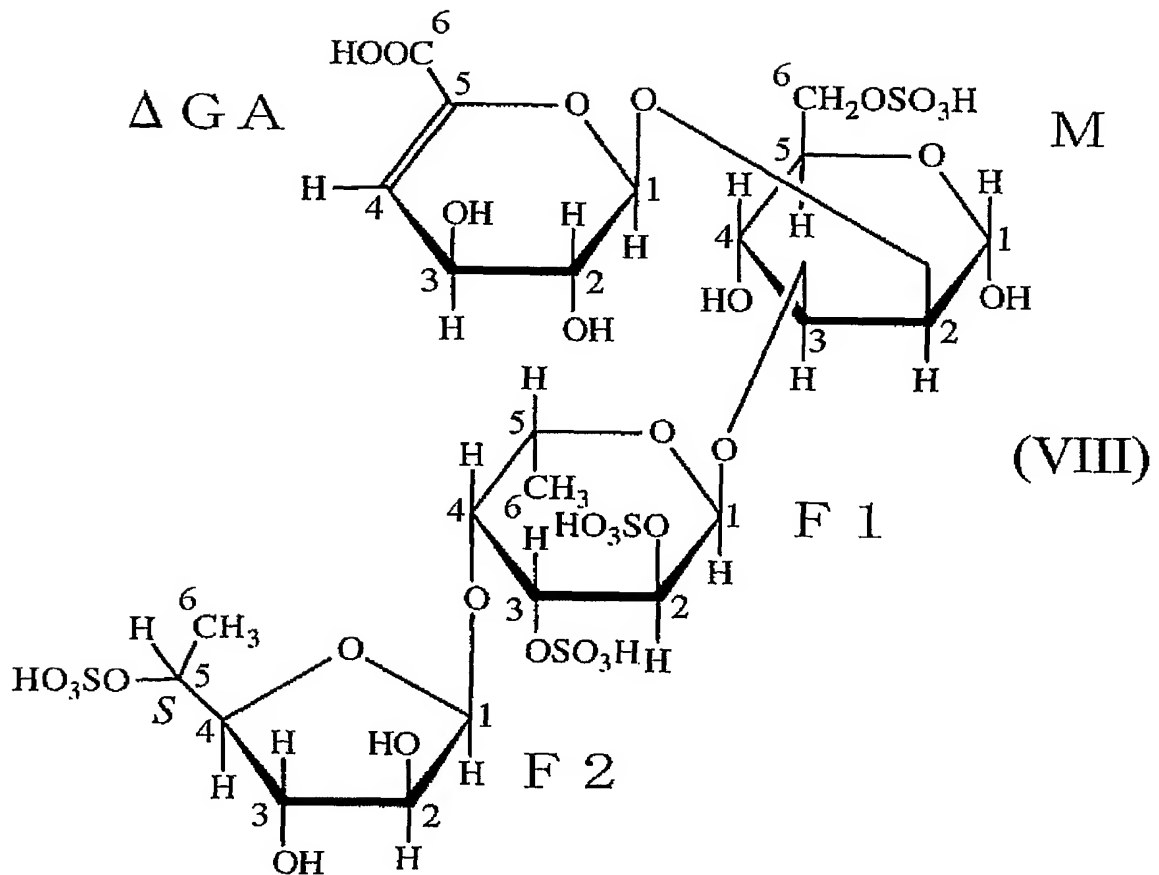
表 8

	化学シフト値 (p p m)
	¹ H-NMR 化学シフト値、多重度、結合定数
M-1	5.32, d, 2.0
M-2	4.26, m
M-3	3.93, m
M-4	3.84, t, 9.5
M-5	3.93, m
M-6	4.10, dd, 7.0, 11.5 4.20, m
ΔGA-1	5.17, d, 7.0
ΔGA-2	3.63, t, 7.0
ΔGA-3	4.19, m
ΔGA-4	5.59, d, 3.0
ΔGA-5	—
ΔGA-6	—

糖組成 L-フコース : D-マンノース : 不飽和グルクロン酸 = 2 : 1 : 1

5 硫酸基 4分子

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(VIII)の通りである。



実施例 4 組換え硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを用いた硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖の調製、精製、及び構造解析

(1) 調製

参考例 4 記載の硫酸化フコグルクロノマンナン画分に、国際公開第 WO 99/11797 号パンフレット記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの遺伝子を大腸菌に組み込んで生産させた組換え硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させ、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を調製した。すなわち、0.4 g の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フコグルクロノマンナン画分を 40 ml の 400 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解後、5 ml の組換え硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ溶液 (66 U 相当) を加え、25℃で 25 時間反応させた。反応液を 10% エタノールで平衡化させたセルロファイン GCL-1000 のカラム (4×87 cm) にかき、1 画分あたり 9.5 ml で分取した。溶出画分のうち第 83-120 画分を集め、硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画

分3とした。

(2) 精製

実施例4-(1)で得られた硫酸化フコグルクロノマンナン酵素消化物画分3を脱塩装置(マイクロアシライザーG3、旭化成工業製)で脱塩し、10mMとなるようにイミダゾールを添加し、10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した20mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、40mlの同じ緩衝液で洗浄後、0~800mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させた。各フラクションの232nmの吸光度を測定し、総糖量をフェノール-硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾール-硫酸法で測定した。その結果、200mM及び300mM塩化ナトリウムで溶出される部分に、232nmの吸光度と総糖量と総ウロン酸量が比例するピークが検出されたのでそれぞれのピーク部分を集めオリゴ糖3-(1)及び3-(2)画分とした。

オリゴ糖3-(1)画分をエバポレーターにより1mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(1.2×30cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩後、乾固した。こうして0.7mgの本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖3-(1)を得た。

オリゴ糖3-(2)画分をエバポレーターにより1.0mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(1.2×30cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩後乾固した。こうして1.6mgの本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖3-(2)を得た。

(3) 構造解析

実施例4-(2)で得られた本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖3-(1)及び3-(2)について、2-アミノピリジンで蛍光標識し、還元末端糖及び糖組成の分析を行ったところ、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖3-(1)及び3-(2)の還元性末端糖はともにマンノースであった。また、中性糖組成は、ともにフコースとマンノースからなるものであった。次に、硫酸含量(塩化バリウムを用いた比濁法による)、ウロン酸含量(カルバゾール-硫酸法による)を測定し、質量分析装置(API-III、パーキンエルマー・サイエクス社製)で質量を分析した。また、JNM-α500型核磁気共鳴

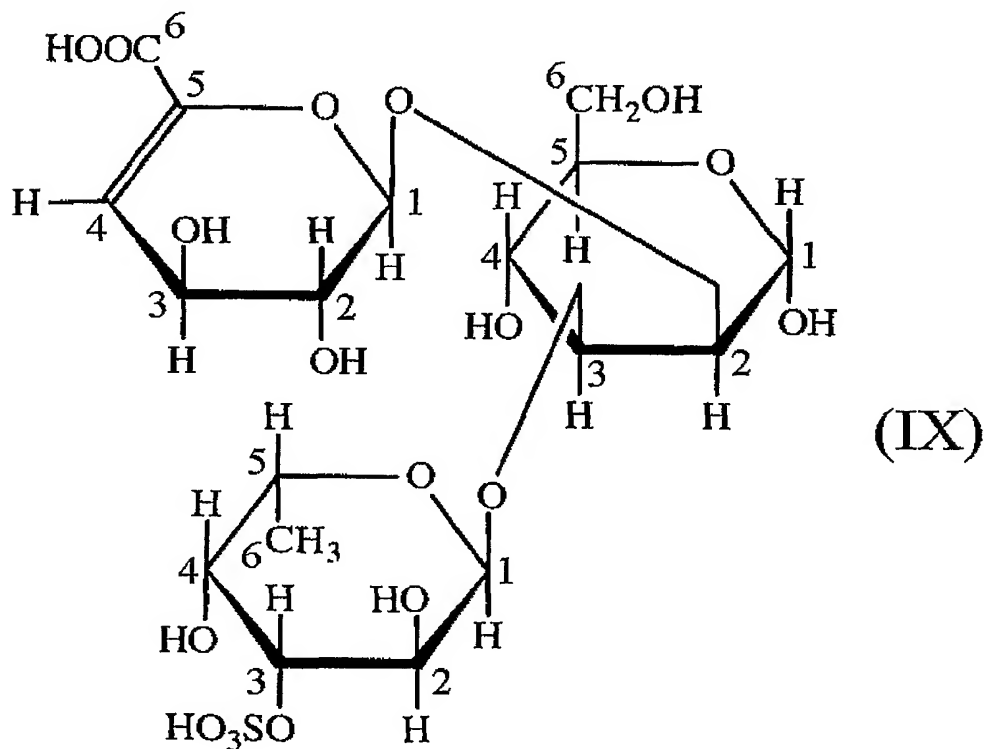
装置（日本電子社製）でNMR分析を行った。分析試料は定法により重水で置換後、構造解析を行った。構成糖の結合様式は、 ^1H -検出異種核検出法であるHMB C法を用いて行った。 ^1H -NMRの帰属にはDQF-COSY法及びH O H A H A法を用いた。

- 5 以下に本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 3-（1）及び 3-（2）の物性を示す。

（a）本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 3-（1）の物性

上記分析の結果、本物質は、既に報告されているオリゴ糖と同じ構造であることが判明した。

- 10 その構造を下記式（IX）に示す。



（b）本発明の硫酸化グルクロノマンナンオリゴ糖 3-（2）の物性

上記分析の結果、本物質は本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖 2-（3）と同じ物質であることが判明した。

- 15 実施例 3 と実施例 4 を比較すると、実施例 4 では、使用した硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは 200 倍以上であるが、基質重量に対するオリゴ糖の生成効率が 1/5 未満である。また、実施例 3 では 6 種類のオリゴ糖が得られてい

るが、実施例 4 では 2 種類のオリゴ糖が得られたのみである。すなわち、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼは *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フコグルクロノマンナンを効率良く分解するが、実施例 4 で使用したリコンビナント硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの場合は *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フコグルクロノマンナンをあまり分解することができない。

実施例 5 本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの分子量の測定

実施例 1 記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの粗酵素溶液を、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化カルシウム、及び 5 mM アジ化ナトリウムを含む 10 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したセファクリル S-200 のカラム (4.4 × 100 cm) でゲルろ過し、溶出液を 13.5 ml ずつ分取した。参考例 7 記載と同様の方法で、各フラクションの本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの活性を測定した。こうして、決定された本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの分子量は約 50 ~ 60 万であった。

実施例 6 分子種の少ないフコイダン画分の製造

参考例 1 記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖混合物画分を用いて分子種の少ないフコイダン画分を調製するため、500 ml の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、50 ml の 4 M 塩化ナトリウム、10 ml の実施例 1 記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ粗酵素溶液、5 g の参考例 1 記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖画分を混合後、25℃で 5 日間反応させた。分解された硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖を透析で除去し、硫酸化多糖画分から硫酸化フコグルクロノマンナンを除去した本発明の分子種の少ないフコイダン画分を調製した。

実施例 7 硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの作用部位の構造

本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼにより、生成されるオリゴ糖の還元性末端糖は総てマンノースで、非還元性末端には不飽和グルクロン酸があり、反応の進行とともに 232 nm の吸光度が増加することから、本酵素は、国際公開第 96/34004 号パンフレット記載のように、硫酸化フコグルクロノ

マンナンのマンノースとグルクロン酸の間のマンノシル結合を脱離的に切断する酵素であると推定された。

推定通りの酵素であれば、*Fucus vesiculosus* 由来フコイダンにはグルクロン酸とマンノースが交互に結合した糖鎖のマンノースからフコースの側鎖が伸びている構造を持つ多糖（硫酸化フコグルクロノマンナン）が存在
5 することになる。褐藻類由来硫酸化他等混合物からマンノースとグルクロン酸からなる多糖（グルクロノマンナン）を得る方法として、シュウ酸処理が知られている（*Carbohydrate Research*, vol. 125, 283
- 290 (1984)）。そこで *Fucus vesiculosus* にも推定
10 通り硫酸化フコグルクロノマンナンが含まれているかどうかを確かめるため、本方法を参考にして、*Fucus vesiculosus* 由来フコイダンを処理し、その構造を分析した。

すなわち、参考例 1 の方法で製造した *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖混合物画分 1 g を 100 ml の水に溶解後、4.5 g のシュウ酸を加え、6 M 水酸化ナトリウムで pH を 1.0 とし、100℃で 5 時間処理し、6
15 M 水酸化ナトリウムで、pH を 8 とし、遠心分離した。得られた上清にエタノールを 85% となるように添加し、2 時間放置後、遠心分離で沈殿を得た。沈殿を 3000 ml の 10 mM イミダゾール塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解後、30 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM イミダゾール塩酸緩衝液（pH 8.0）
20 で平衡化した 100 ml の DEAE-セルロファインにかけ、同緩衝液で洗浄後、30 mM ~ 500 mM の塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させた。溶出画分を 10 ml ずつ分画し、それぞれの中性糖含量及びウロン酸含量をフェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法で測定した。溶出塩化ナトリウム濃度 120 ~ 250 mM に中性糖とウロン酸を含む主成分が溶出されたので、この画分を集め、電気透析機で脱塩後凍結乾燥し、重水置換後 NMR 分析を行った。この結果、本物質は *Carbohydrate Research*, vol. 125, 283-290
25 (1984) に記載のグルクロノマンナンと同じ構造であることが確認できた。

すなわち、本発明のオリゴ糖に含まれている不飽和グルクロン酸は、本発明の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの作用により硫酸化フコグルクロノマン

ナンのグルクロン酸から生成されることがわかった。

また、同時に、*Fucus vesiculosus* 由来フコイダンにはフコフラノースを含む新規な硫酸化フコグルクロノマンナンが含まれることが分かった。

5

産業上の利用の可能性

本発明により硫酸化フコグルクロノマンナンの構造解析や硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖の再現性よい製造に用いることができる新規の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ及び該酵素の製造方法が提供される。また、該酵素を使用することにより製造できる、糖鎖工学用試薬として有用な硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖や分子種の少ないフコイダン画分及びそれらの製造方法が提供される。

10

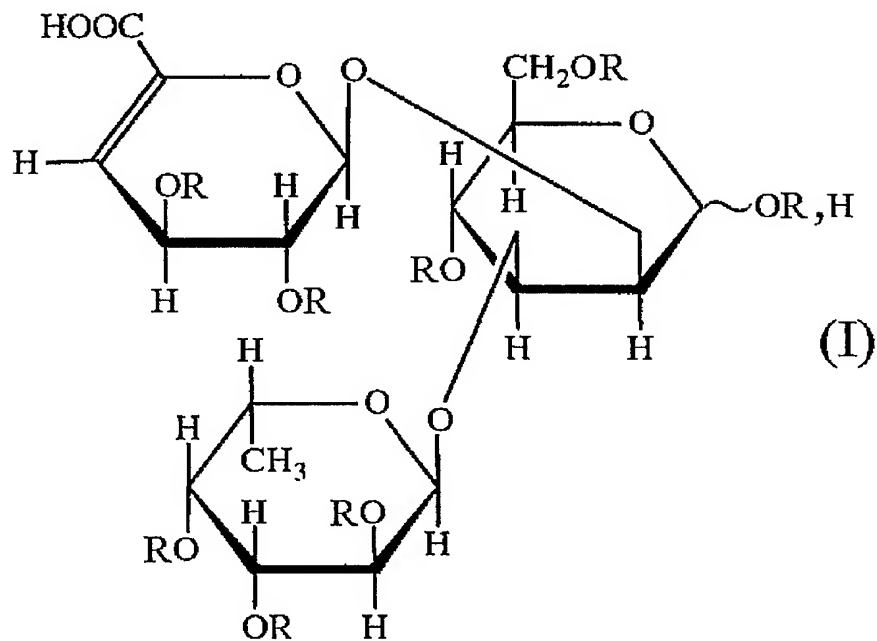
配列表フリーテキスト

15

SEQ ID NO:1: 16S rDNA region of *Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234

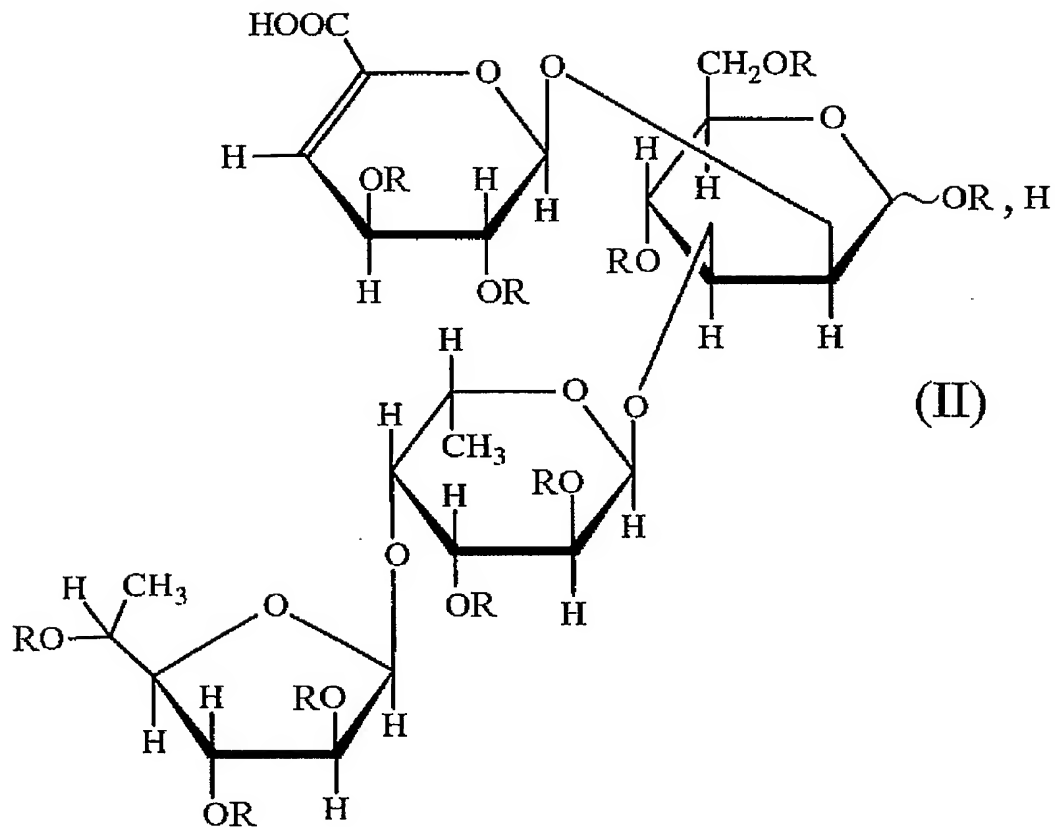
請求の範囲

1. 下記一般式 (I) あるいは (I I) で表される硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖又はその塩。



5

(Rは、H又はSO₃Hである。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

2. 下記の理化学的性質を有することを特徴とする硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ:

- 5 (I) 作用: ヒバマタ目海藻由来硫酸化フコグルクロノマンナンに作用して α -D-マンノシル結合を脱離的に切断し、不飽和グルクロン酸基を持つオリゴ糖を生成させる;

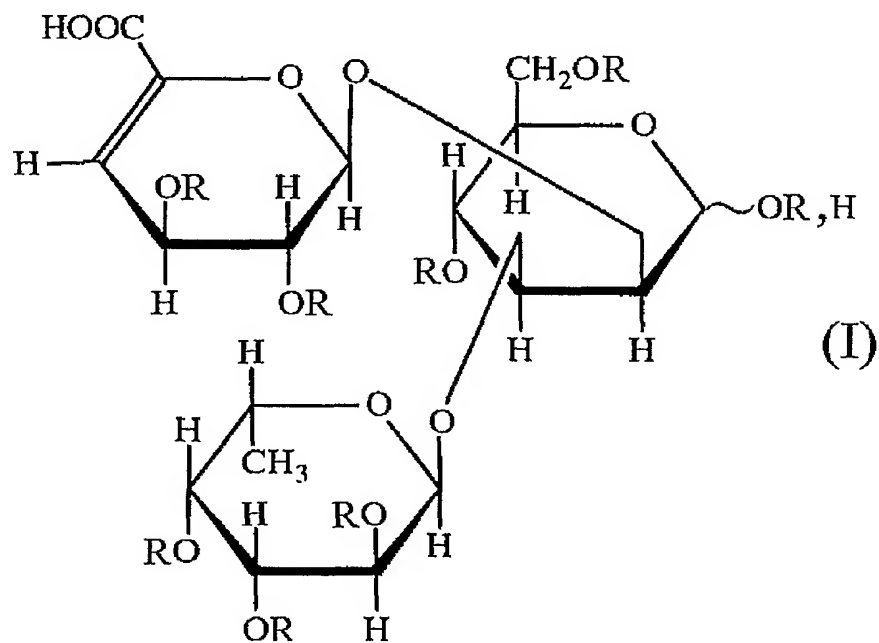
(I I) 至適pH: 本酵素の至適pHは約6.5~8.0付近である; および

(I I I) 至適温度: 本酵素の至適温度は約30℃~40℃である。

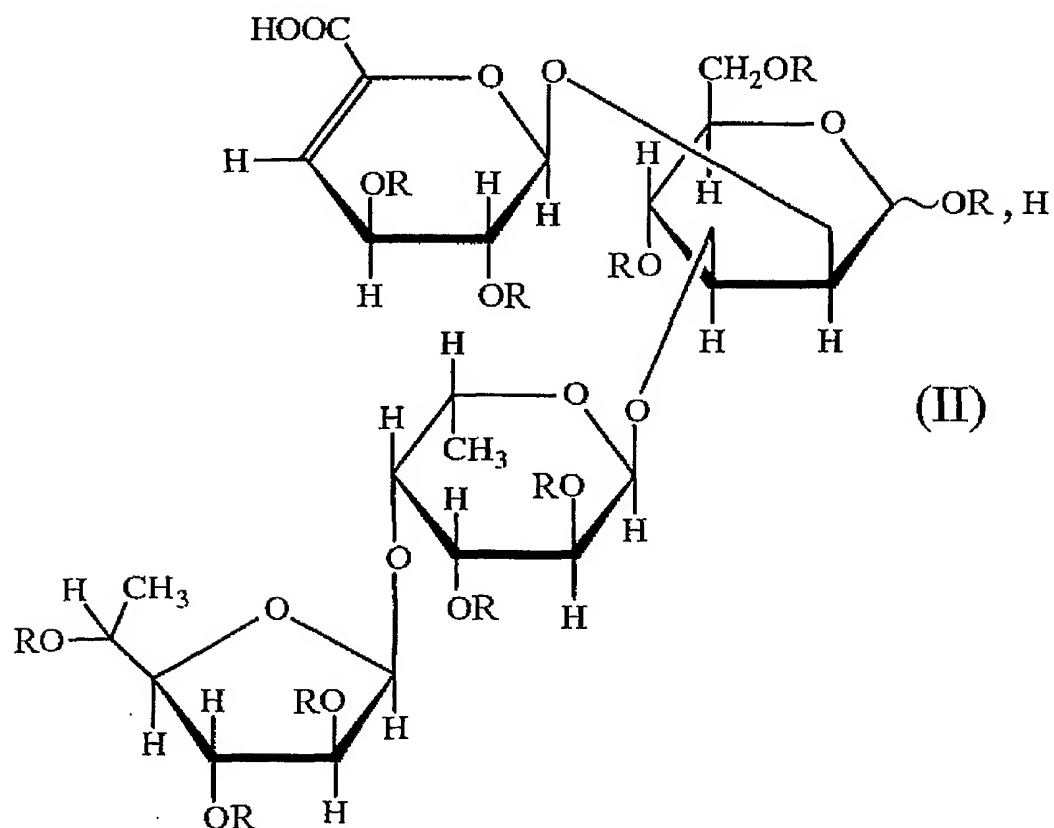
- 10 3. 請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼ生産能を有するフコフィラス (Fucophilus) 属細菌を培養する工程およびその培養物から該酵素を採取する工程を包含することを特徴とする請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼの製造方法。

- 15 4. 請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼをヒバマタ目海藻由来硫酸化フコグルクロノマンナン含有画分に作用させる工程を包含することを

特徴とする下記一般式 (I) あるいは (II) で表される硫酸化フコグルクロノマンナンオリゴ糖又はその塩の製造方法。



(Rは、H又はSO₃Hである。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

5. 褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させて低分子化した硫酸化フコグルクロノマンナンを除去する工程を包含する方法によって得られることを特徴とするフコイダン画分。

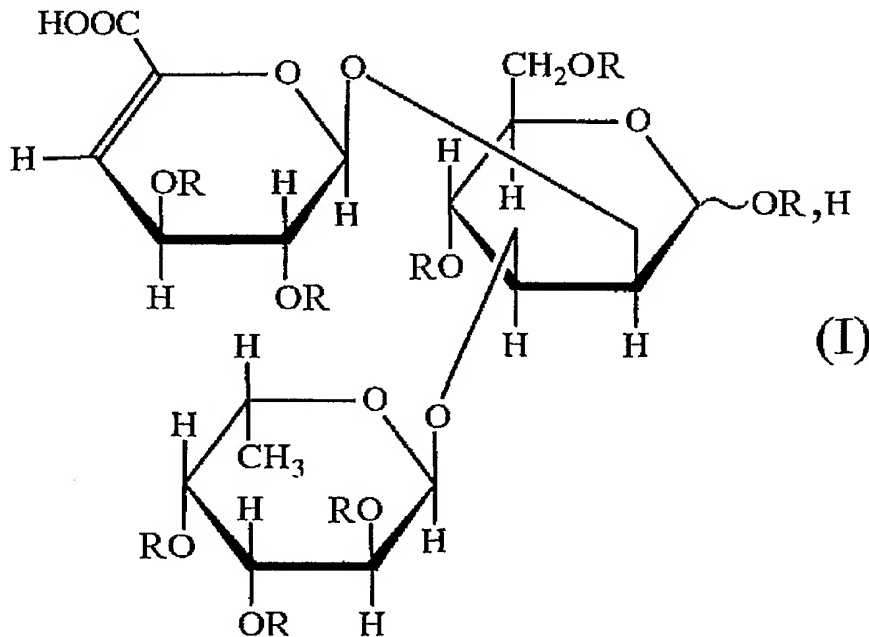
5 6. 褐藻類由来硫酸化多糖混合物画分に請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを作用させる工程およびフコイダン画分を採取する工程を包含することを特徴とするフコイダン画分の製造方法。

7. 請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼを含むことを特徴とする糖質工学用試薬。

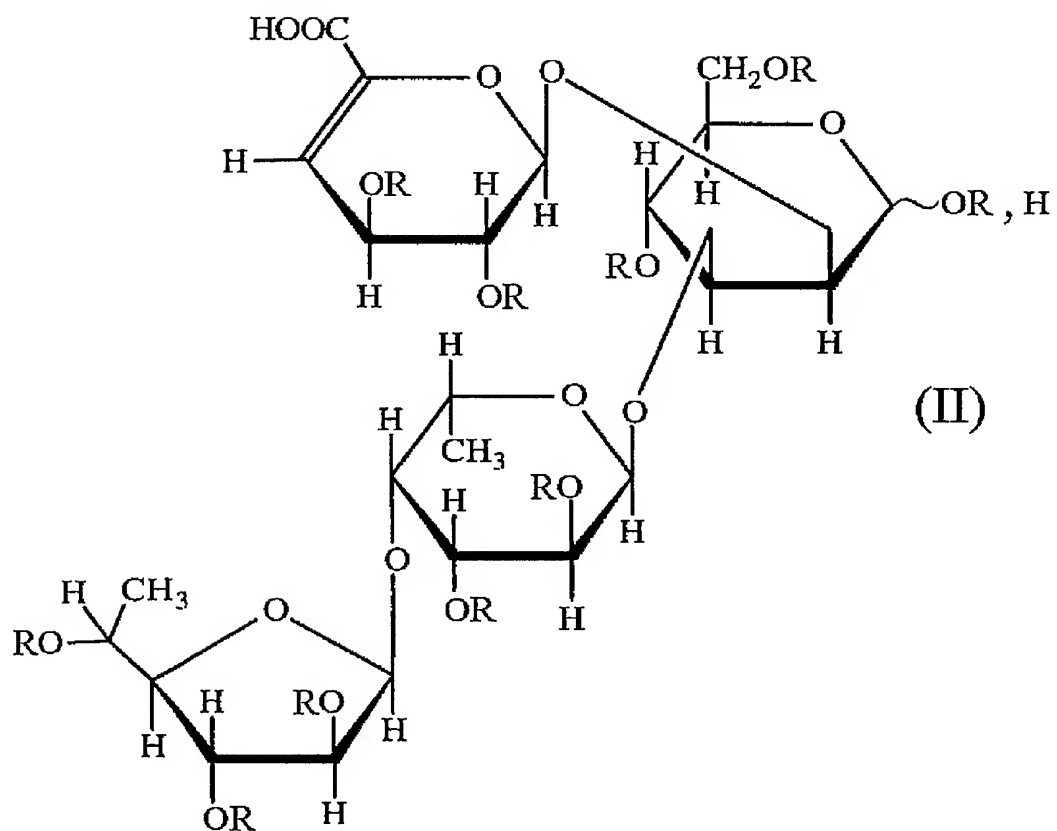
10 8. 下記の理化学的性質を有することを特徴とする硫酸化フコグルクロノマンナン又はその塩：

(1) 構成糖：フコース、マンノース及びグルクロン酸を含有し、

(2) 請求項2記載の硫酸化フコグルクロノマンナンリアーゼにより低分子化され、下記一般式(I)又は(II)で表される化合物より選択される1種類以上の化合物が生成する：



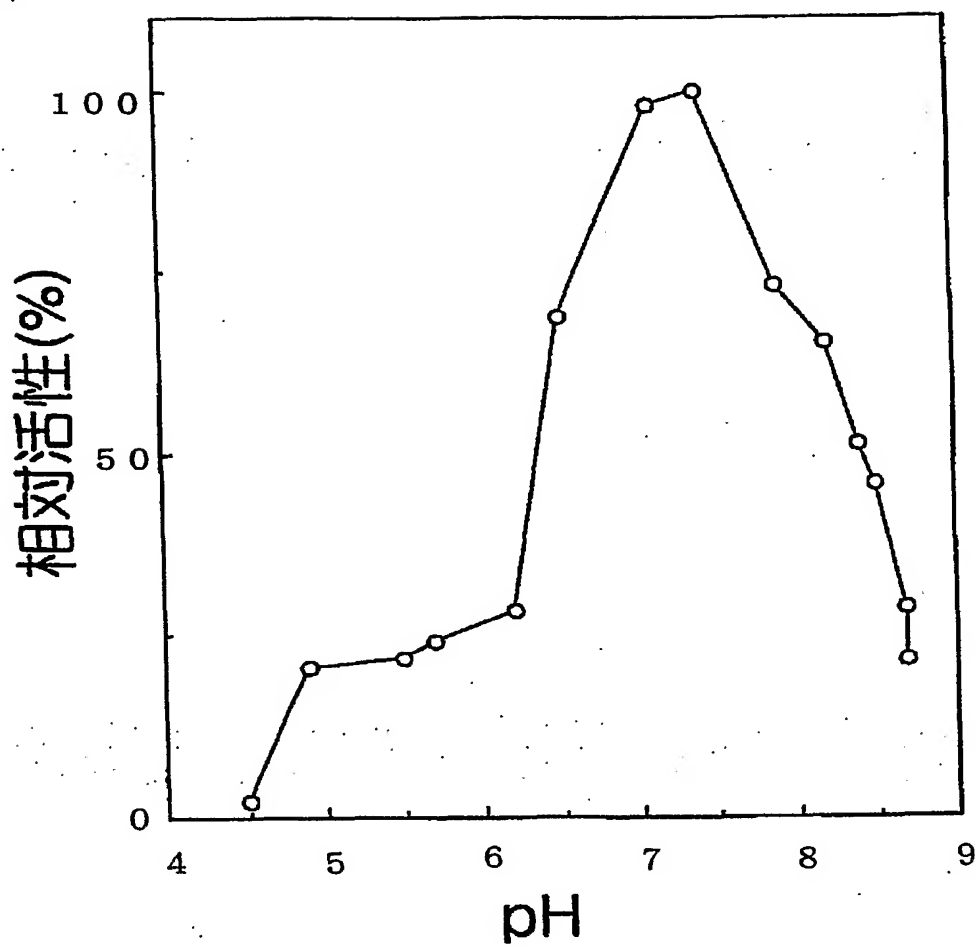
(Rは、H又はSO₃Hである。)



(Rは、H又はSO₃Hである。)

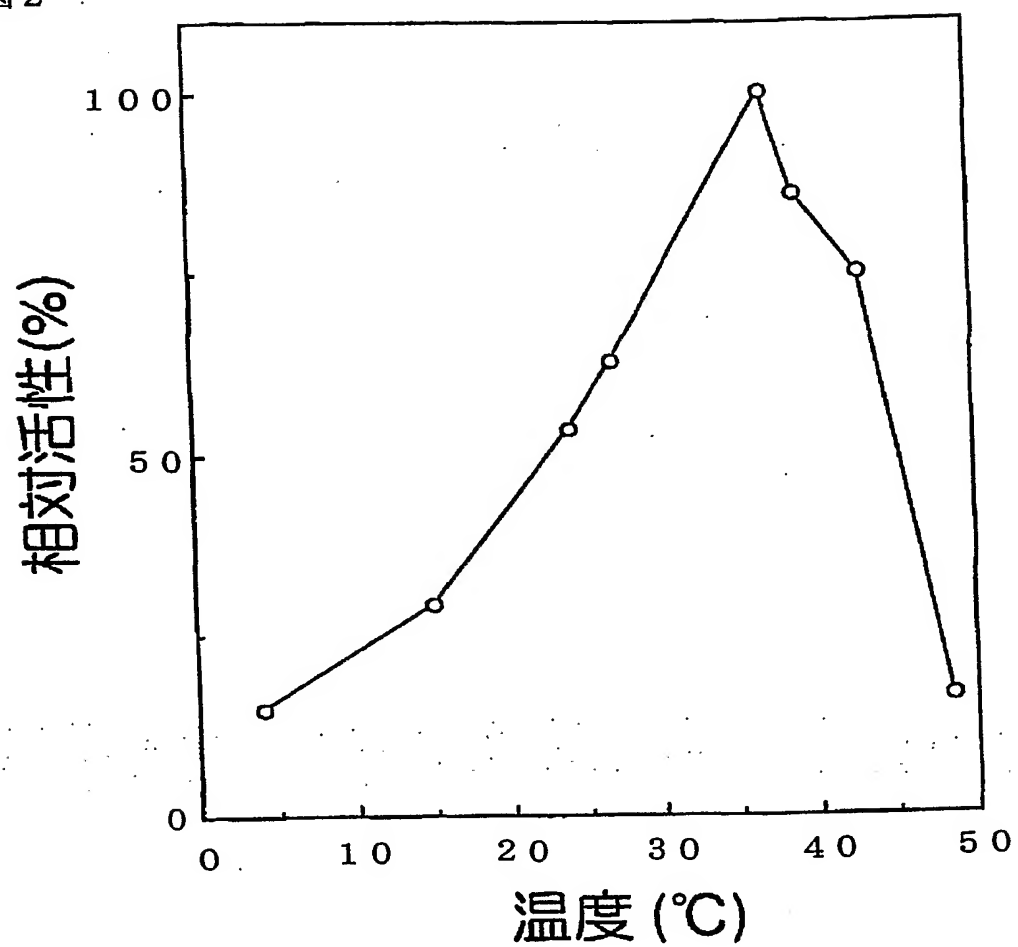
1 / 14

図 1



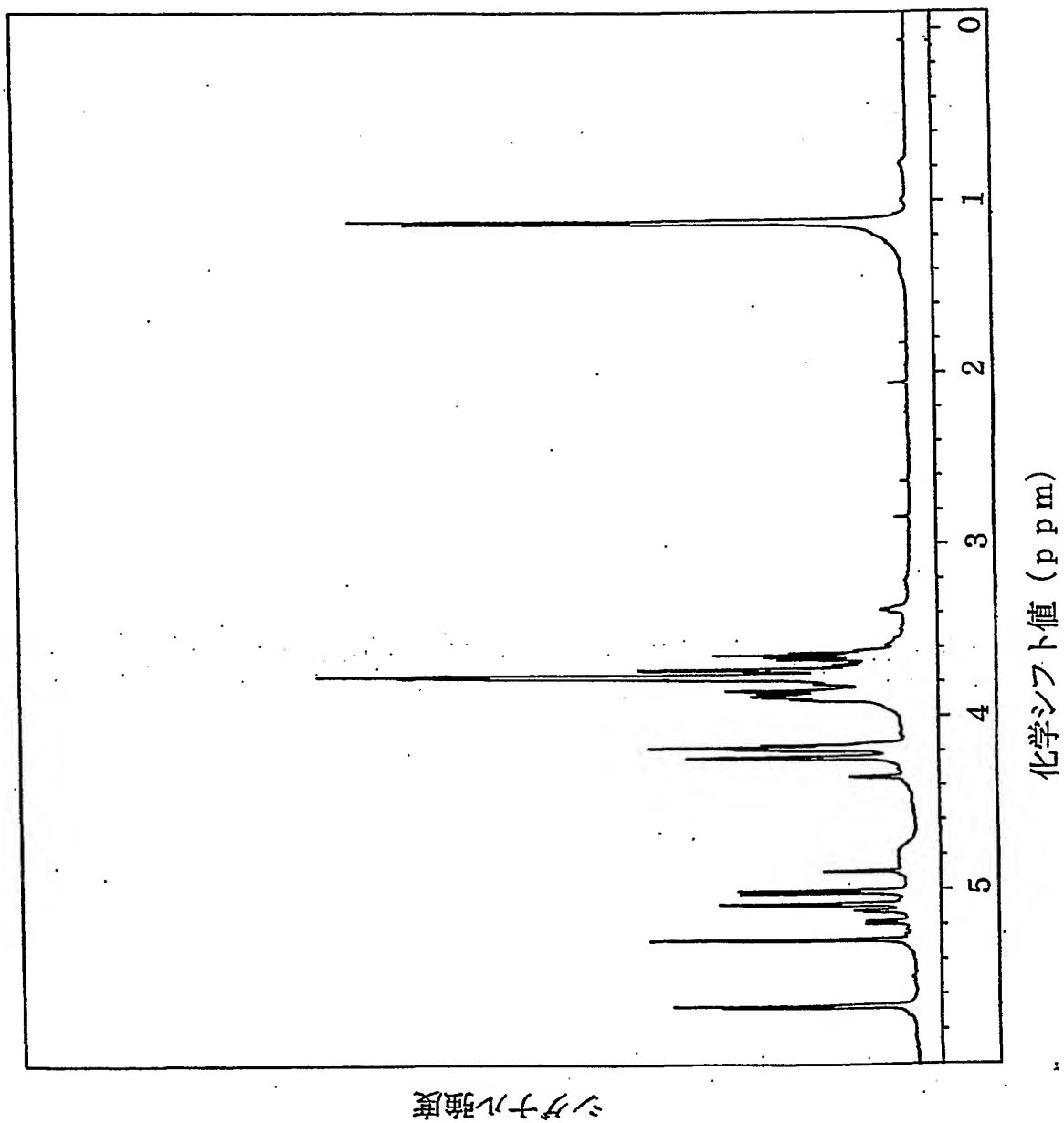
2 / 14

図 2



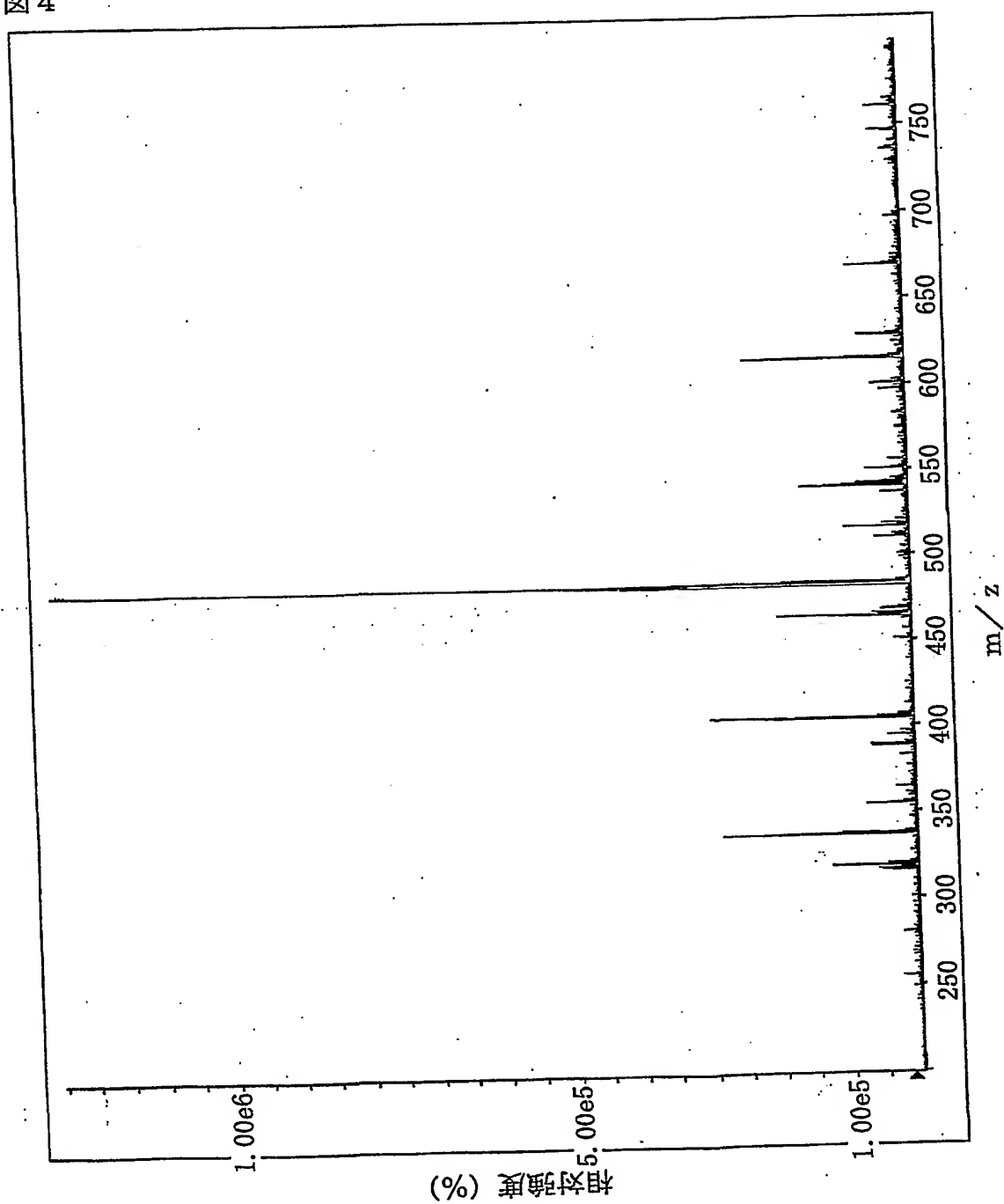
3 / 1 4

図 3



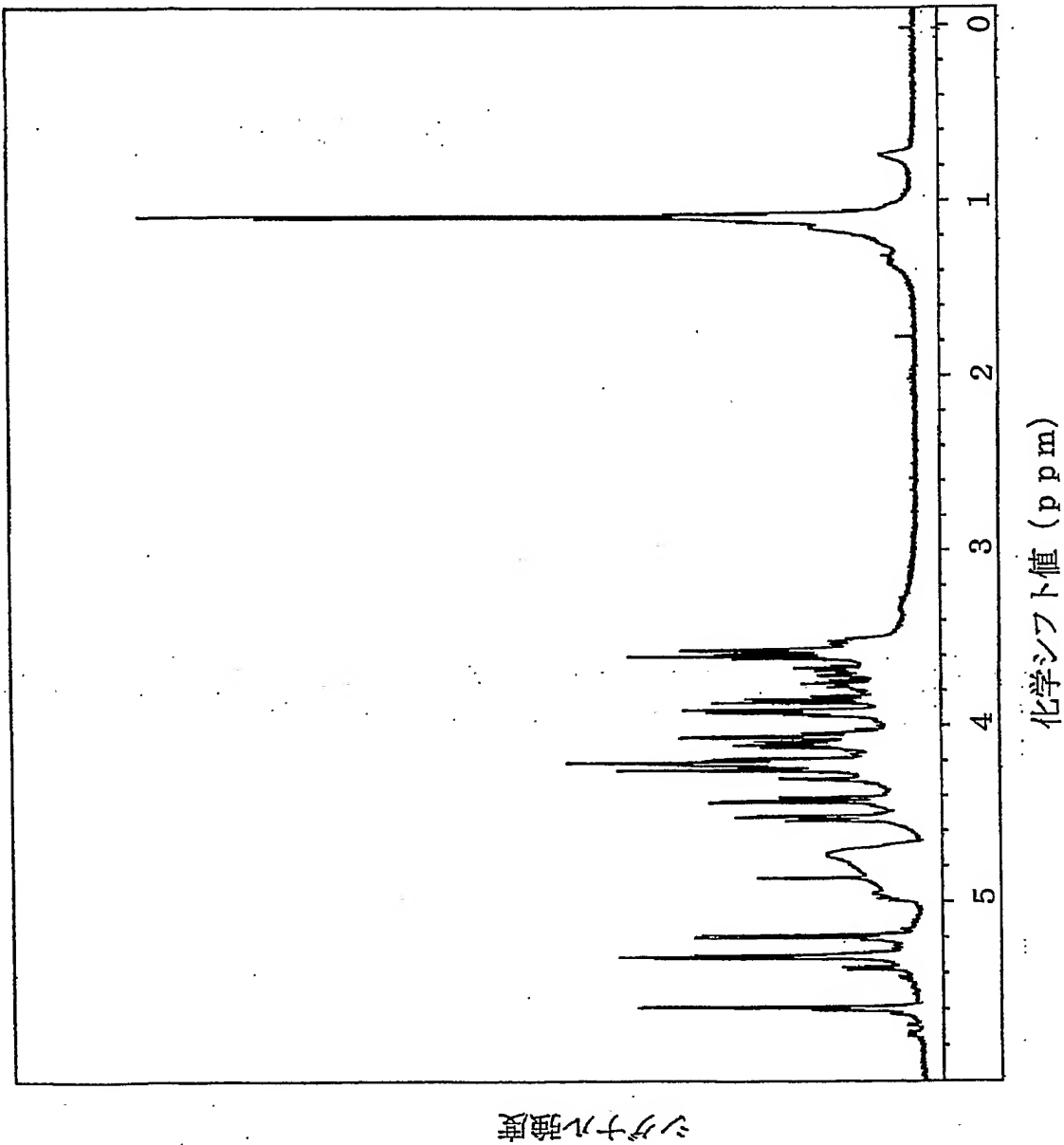
4 / 1 4

図 4



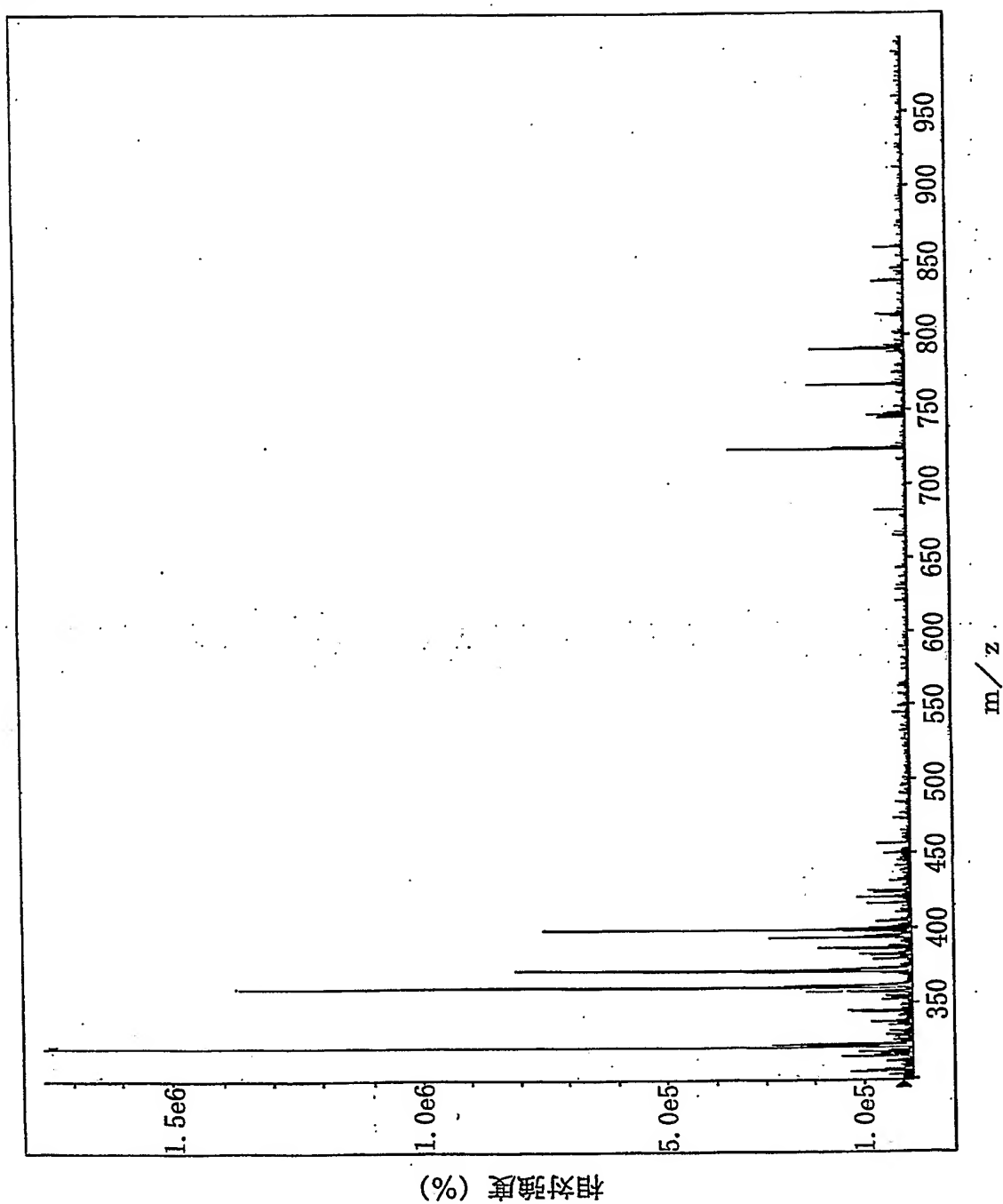
5 / 1 4

図 5



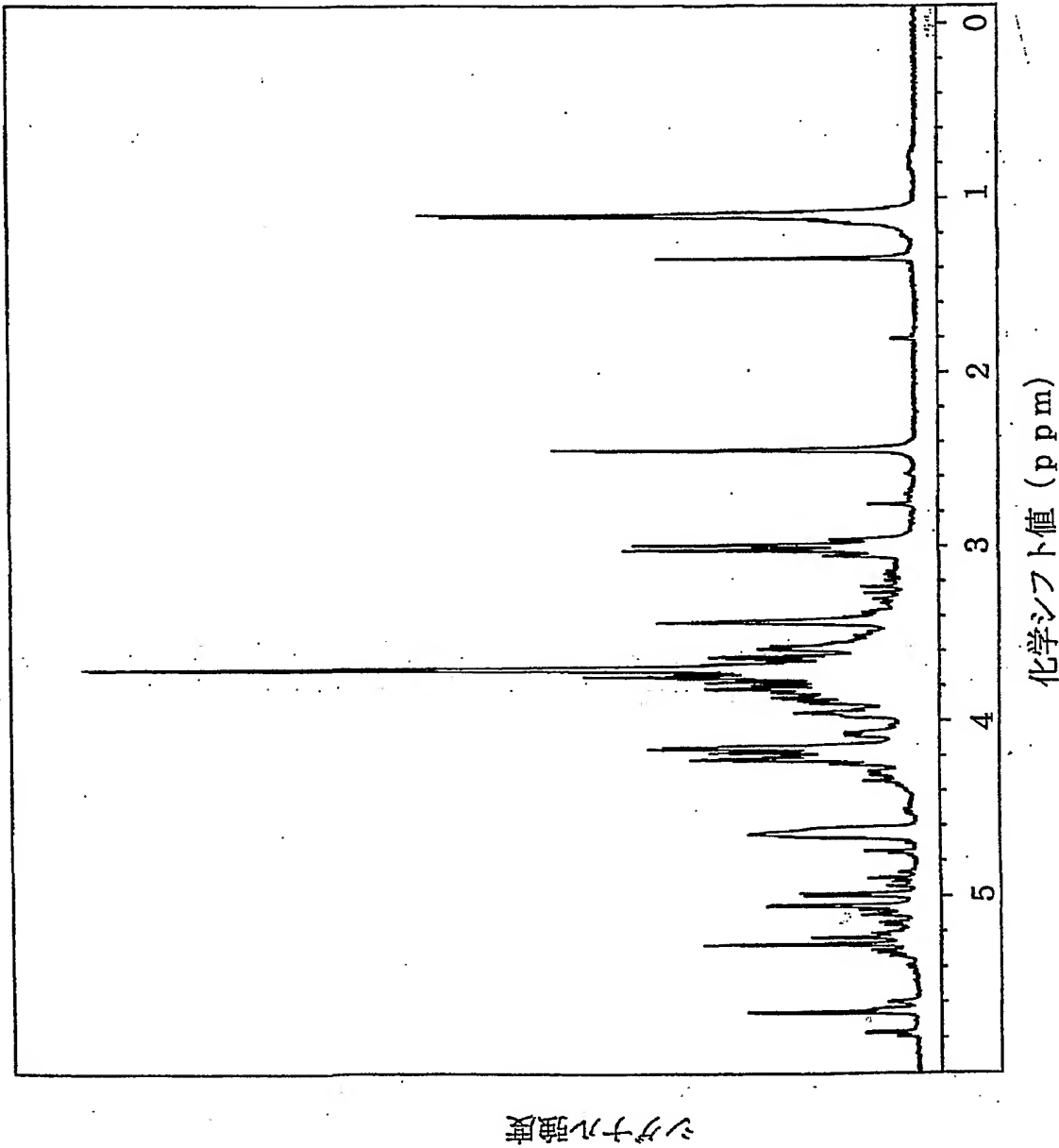
6 / 14

図 6



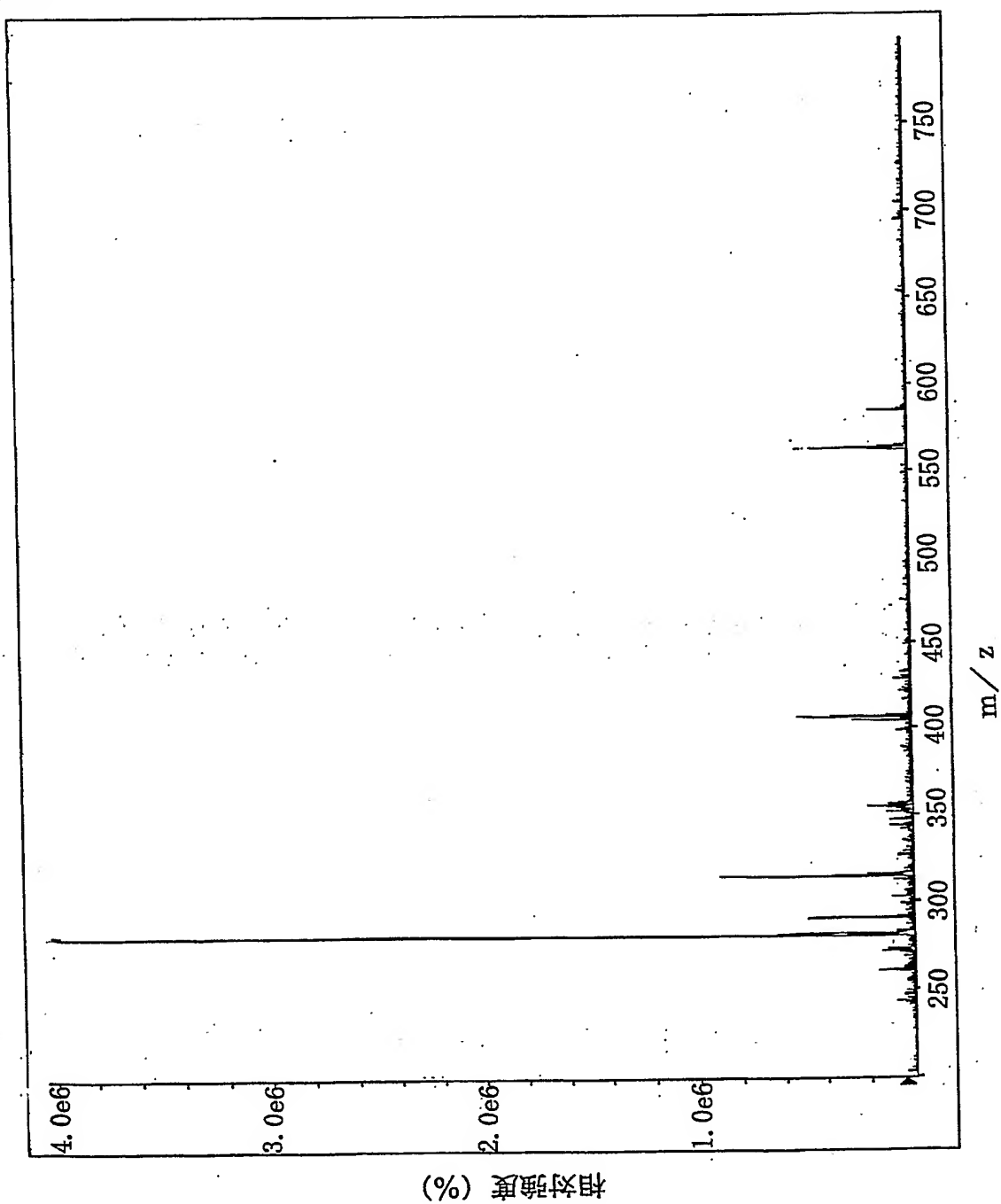
7 / 14

図 7



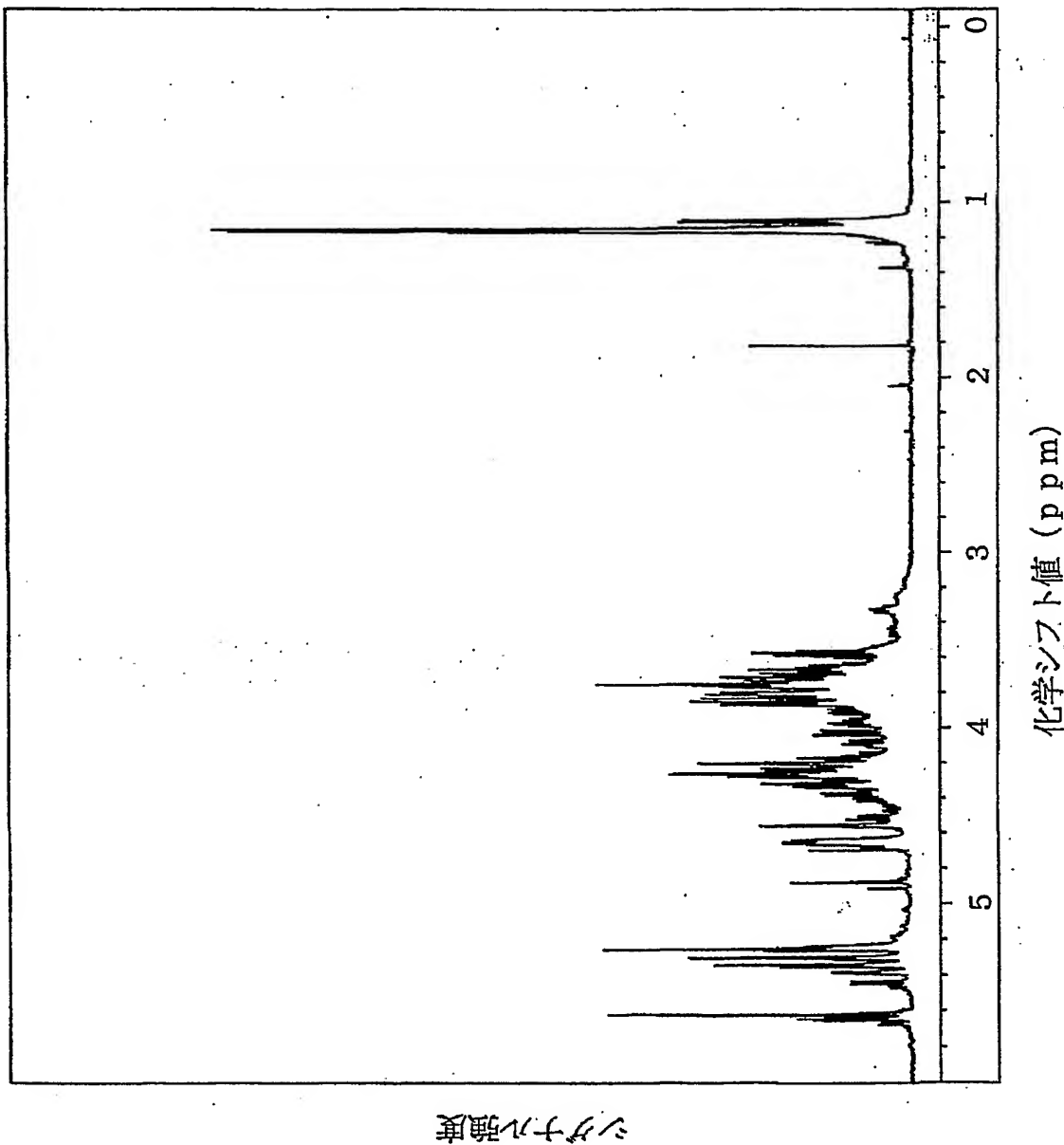
8/14

図 8



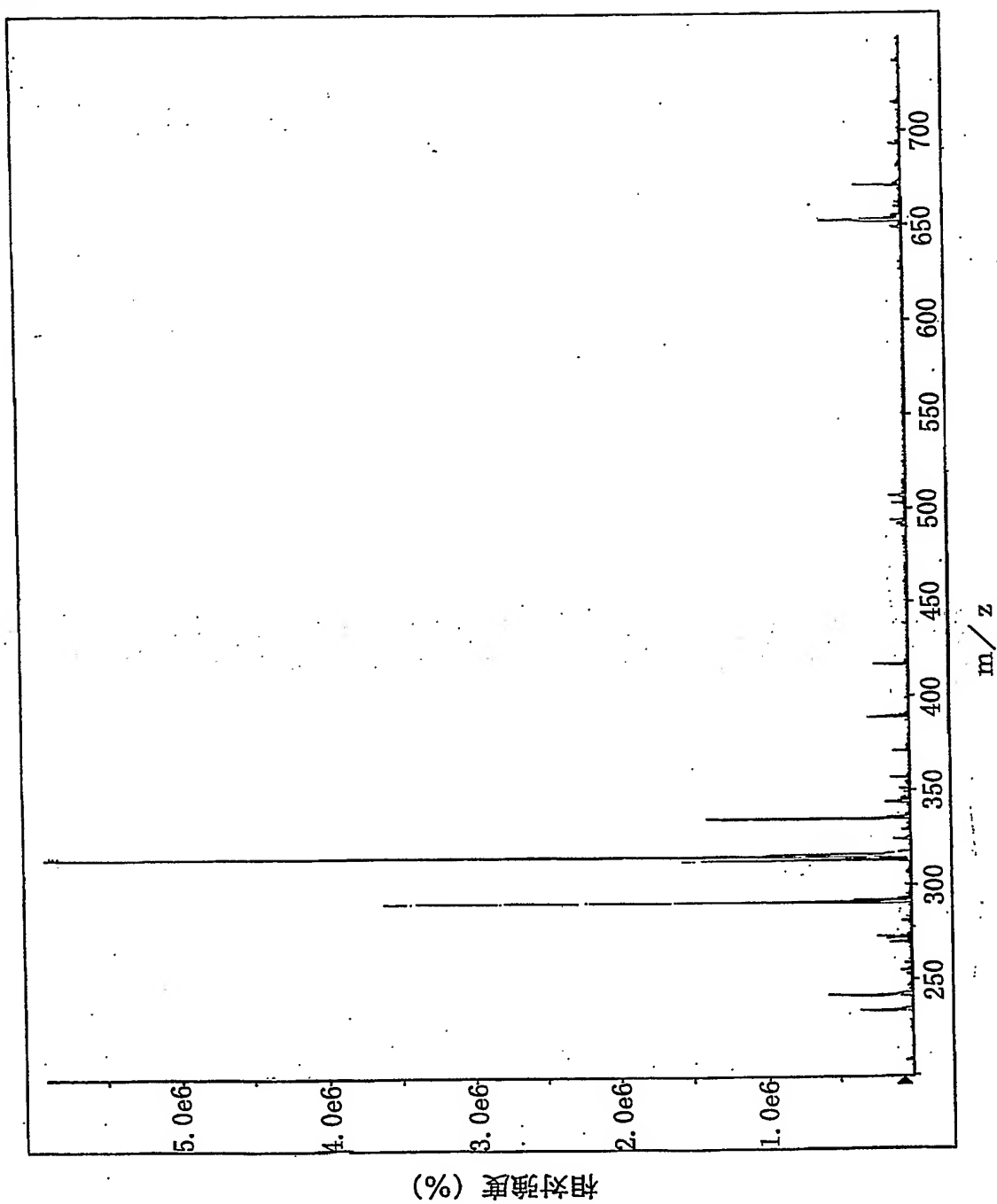
9 / 14

図 9



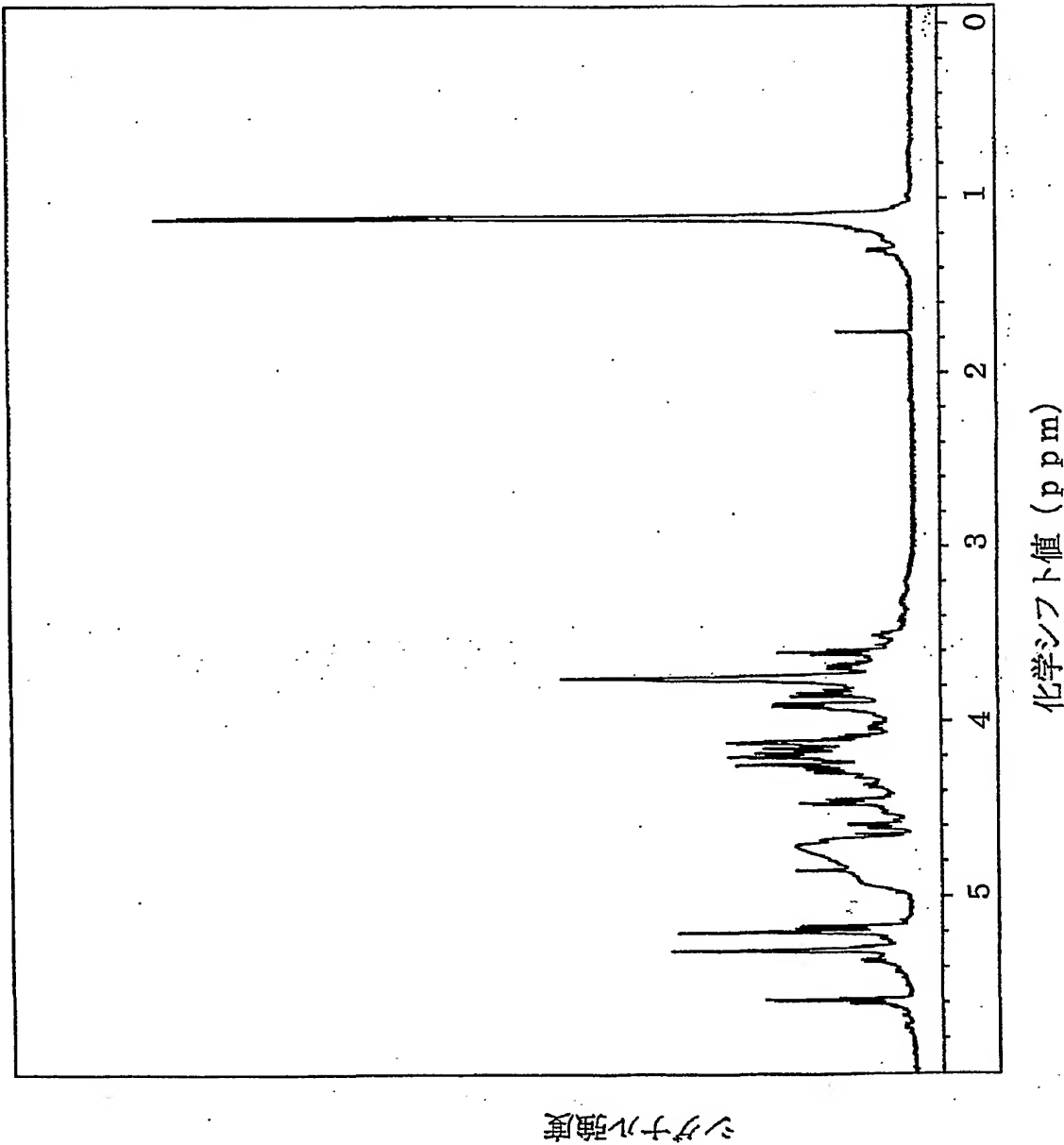
10/14

図 10



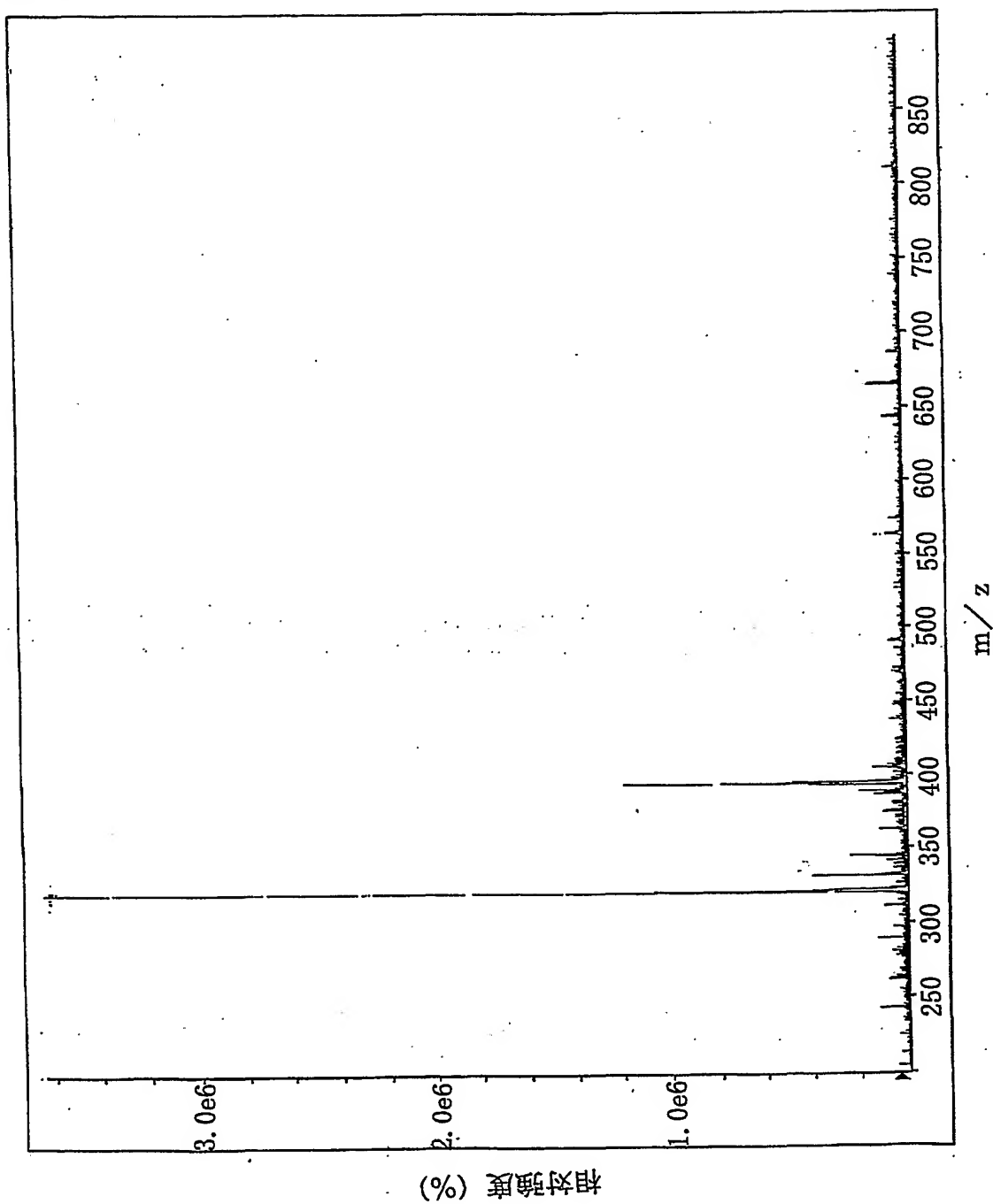
11 / 14

図 11



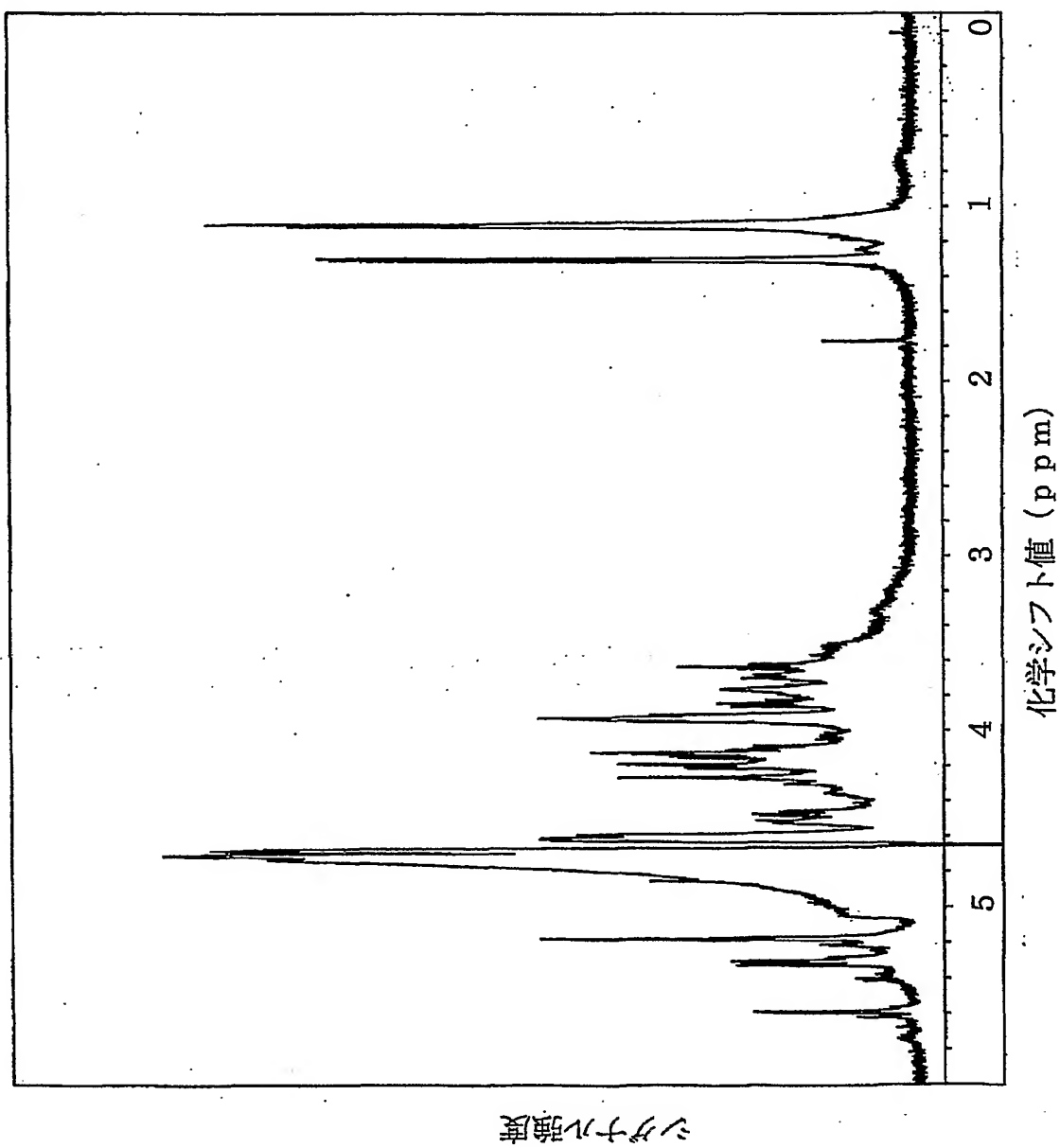
12 / 14

図 12



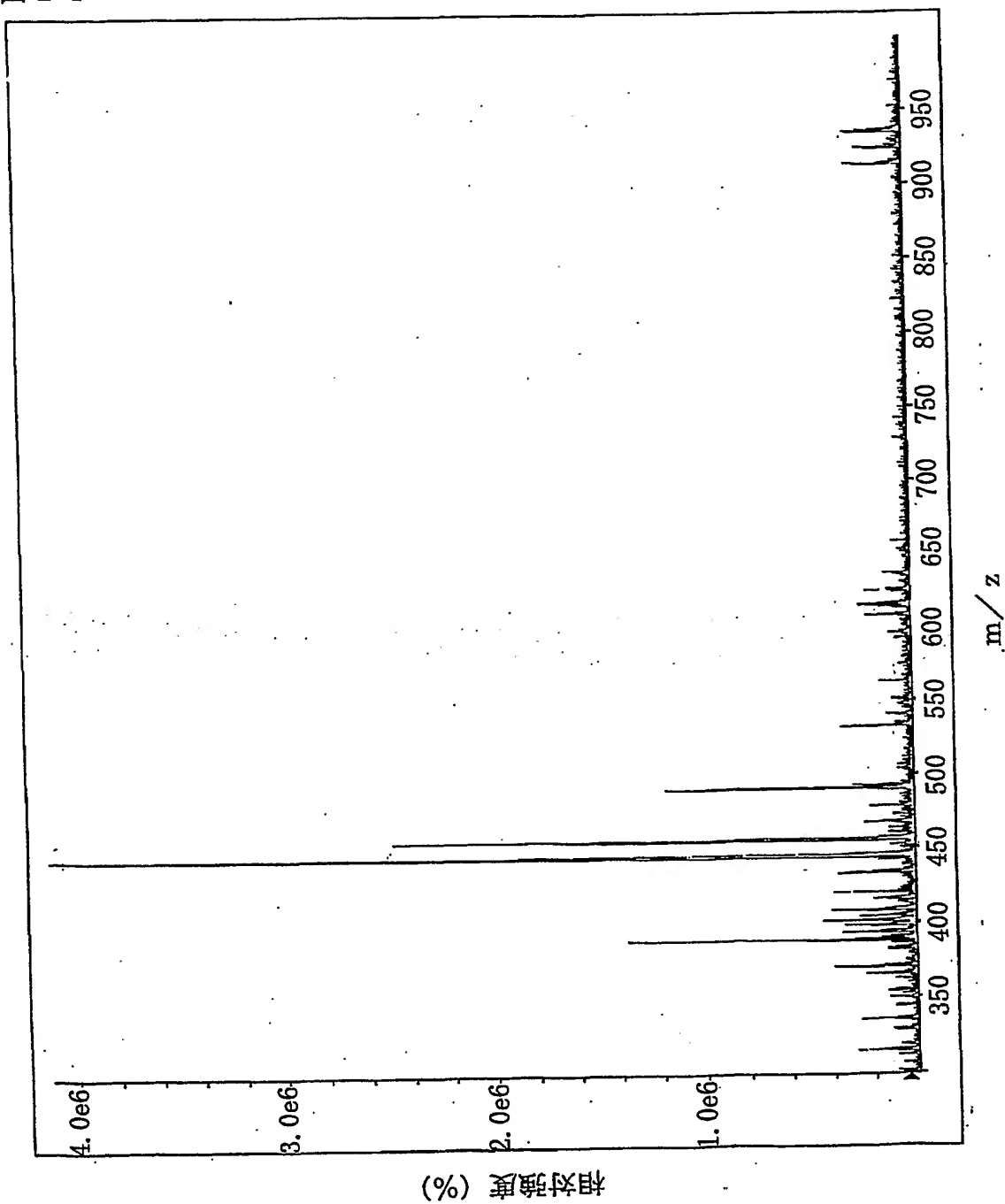
13 / 14

図 13



14 / 14

図 14



SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA HOLDINGS INC.

<120> Sulfated fucoglucuronomannan

<130> 663177

<150> JP 2001-119671

<151> 2001-04-18

<150> JP 2001-155849

<151> 2001-05-24

<160> 1

<210> 1

<211> 1535

<212> DNA

<213> Fucophilus fucoidanolyticus SI-1234

<400> 1

ggatccgata	gagtttgatc	ctggctcaga	gtgaacgctg	gcggcgtggt	taagacatgc	60
aagtcgaacg	agattctttg	tattgaagcc	tcggtggatt	tataaagatg	aaagtggcaa	120
acgggtgcgt	aacacgtgag	caatctgccc	taaagatcgg	aatagctcga	ggaaactcga	180
attaatgccg	gatgtgatac	gccaactcat	gttggtagta	ttaaagcttg	taatggcgct	240
ttaggaggag	ctcgcggcct	atcagcttgt	tggtgaggta	aaggctcacc	aaggcaaaga	300
cgggtagctg	gtctgagagg	atgatcagcc	acactggaac	tgagacacgg	tccagacacc	360
tacgggtggc	agcagtttcg	aatcattcac	aatgggggca	accctgatgg	tgcaacgccg	420

cgtgagggat gaaggccttc gggtcgtaaa cctctgtcac caggagagcaa caagcaggtt 480
 catagcctgc cctgagttaa cctggagagg aagcagtggc taactccgtg ccagcagccg 540
 cggtaatacg gagactgcaa gcgttactcg gattcactgg gcgtaaaggg tgcgtaggcg 600
 gatagatgtg tcagggtgtga aatctcgggg ctcaacctcg aaactgcgcc tgaaactgtc 660
 tatctagagt attggagggg taagcgggaat ttctgggtga gcggtgaaat gcgtagatat 720
 cagaaggaac accaatggcg aaggcagctt actggacaaa tactgacgct gaggcacgaa 780
 agcatgggta gcgaaaggga ttagataccc ctgtagtcca tgccgtaaac gttgcacact 840
 aggtcttggg ggtttcgacc ctttcaggac ccagctaac gcgataagtg tgccgcctga 900
 ggactacggc cgcaaggcta aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga 960
 gcatgtggtt taattcgatg caacgcgaag aaccttacct aggttgaca tgtaatggac 1020
 gattttcaga gatgaatttt tcccttcggg gctgttacac aggtgctgca tggccgtcgt 1080
 cagctcgtgt cgtgagatgt ttggttaagt ccagcaacga gcgcaaccct cgtccttagt 1140
 tgccagcacg taatgggtggg gactctaagg agacaaactc tctttgagag tgggaagggtg 1200
 gggatgacgt caggtcagta tggcccttac gcctagggtt acacacgtgc tacaatgccc 1260
 ggtacaatag gacgcaatac cgcgaggtgg agcaaactct caaaaccggg ccagttcgg 1320
 attggagtct gcaactcgac tccatgaagt cggaatcgct agtaatgacg tatcagctat 1380
 gacgtcgtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacatcat gaaagccggt 1440
 tttgcccga gtagctgagc tatccctcgg gaggcagcgt cctaaggcag ggctgggtgat 1500
 tgggatgaag tcgtaacaag gtagccatcc atatg 1535

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/88, C07H11/00, C12N1/20, C12P19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/88, C07H11/00, C12N1/20, C12P19/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Hitomi KIMURA et al., "Fucophilus fucoidanolytics ga Seisan suru sulfat- ed fucoglucronomannan lyase ni yori Seisei shita Fucus vasiculosus Yurai sulfated fucoglucronomannan Origo-to no Seizo", The 5 th , Japanese Society for Marine Biotechnology Taikai (Marine Bio Shizuoka 2000), Abstracts, 24 May, 2001 (24.05.01), Page 71	1-8
X A	WO 97/26896 A1 (Res. Inst. Glycotechnology), 31 July, 1997 (31.07.97), Full text & AU 9713999 A & JP 9-526724 A & EP 919237 A1 & US 6207652 B1 & CN 1209749 A & KR 99072022 A & JP 2001-218580 A & JP 2001-224394 A & JP 2001-226407 A & JP 2001-226408 A	1, 8 2-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 May, 2002 (31.05.02)Date of mailing of the international search report
11 June, 2002 (11.06.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03853

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 99/11797 A1 (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 11 March, 1999 (11.03.99), Full text & AU 9874516 A & EP 1010761 A1 & CN 1271390 A & JP 11-516565 A & KR 2001023509 A	<u>1</u> 2-8
<u>X</u> A	WO 96/34004 A1 (Res. Inst. Glycotechnology), 31 October, 1996 (31.10.96), Full text & JP 8-532343 A & EP 870771 A1 & AU 9724664 A & KR 99008009 A & US 6054577 A & CA 2217746 C	<u>1</u> 2-8
<u>X</u> A	JP 7-59563 A (Kabushiki Kaisha Tohsa Kogaku Kenkyusho), 07 March, 1995 (07.03.95), Full text (Family: none)	<u>1-7</u> 8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/03853

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/88, C07H 11/00, C12N 1/20, C12P 19/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/88, C07H 11/00, C12N 1/20, C12P 19/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	木村ひとみ 他, Fucophilus fucoidanolyticsが生産する sulfated fucoglucronomannan lyaseにより生成したFucus vesiculosus由来 sulfated fucoglucronomannanオリゴ糖の製造, 第5回マリンバイオテクノロジー学会大会 (マリンバイオ静岡2001) 講演要旨集、2001年5月24日、第71頁	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.05.02

国際調査報告の発送日

11.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 97/26896 A1 (RES INST GLYCOTECHNOLOGY) 1997. 07. 31. , 全文 & AU 9713999 A & JP 9-526724 A & EP 919237 A1 & US 6207652 B1 & CN 1209749 A & KR 99072022 A & JP 2001-218580 A & JP 2001-224394 A & JP 2001-226407 A & JP 2001-226408 A	<u>1, 8</u> 2-7
<u>X</u> A	WO 99/11797 A1 (宝酒造株式会社) 1999. 03. 11, 全文 & AU 9874516 A & EP 1010761 A1 & CN 1271390 A & JP 11-516565 A & KR 2001023509 A	<u>1</u> 2-8
<u>X</u> A	WO 96/34004 A1 (RES INST GLYCOTECHNOLOGY) 1996. 10. 31. , 全文 & JP 8-532343 A & EP 870771 A1 & AU 9724664 A & KR 99008009 A & US 6054577 A & CA 2217746 C	<u>1</u> 2-8
<u>X</u> A	JP 7-59563 A (糖鎖工学研究所) 1995. 03. 07. , 全文 (ファミリー無し)	<u>1-7</u> 8